

Síntese de novos derivados de rodamina para aplicações em biologia e ambiente

Maria da Graça Marques do Couto

Mestrado em Química

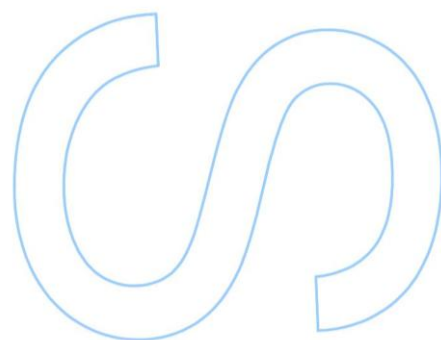
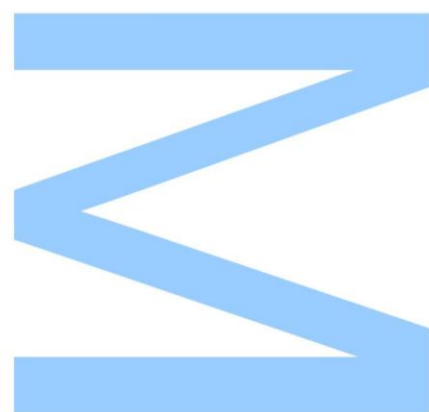
Departamento de Química e Bioquímica
2013

Orientador

Professora Doutora Alberta Paula Lobo Machado Gameiro dos Santos,
Professora Auxiliar com Agregação, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Co-orientador

Doutora Ana Margarida Gomes da Silva, Investigadora Auxiliar do
REQUIMTE, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Maria da Graça Marques do Couto

Síntese de novos derivados de rodamina para aplicações em biologia e ambiente

Composição do Júri

Maria Clara Ramalho Monteiro Pires Basto, Professora Auxiliar do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto – Presidente do Júri;

Alberta Paula Lobo Machado Gameiro dos Santos, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto;

Baltazar Manuel Romão de Castro, Professor Catedrático do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto;

Vera Lúcia Marques da Silva, Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro - Arguente.

Agradecimentos

No final deste trabalho agradeço de um modo especial:

À Professora Doutora Paula Gameiro, orientadora desta dissertação pela possibilidade de realizar este trabalho e pela disponibilidade e apoio prestado.

À Doutora Ana Margarida Silva, co-orientadora desta dissertação, pelo apoio e orientação prestada, simpatia e incentivo sempre presentes.

À Doutora Maria da Conceição Rangel pela disponibilidade e apoio prestado.

Ao Doutor Luís Cunha-Silva pelo contributo prestado nos estudos de cristalografia de Raios-X.

Ao CeNTI, em especial à Dra Andrea Carneiro pela cedência do reator monomodo de micro-ondas.

À Carla Queirós, pela simpatia e por toda a ajuda prestada na execução deste trabalho.

À Tânia Moniz, pela ajuda e simpatia.

À minha avó (em memória) e minha tia Fátima pela presença e preocupação demonstrada.

Ao meu Pai (em memória) e à minha Mãe pela paciência e incentivo constante, a eles um Muito Obrigada por me darem a oportunidade de estudar.

Dedicado ao meu Pai

Resumo

A síntese de novos compostos fluorescentes derivados da rodamina tem merecido especial atenção por parte da comunidade científica nos últimos anos.

Os derivados da rodamina pertencem à família dos xantenos e são de grande interesse, pois possuem propriedades fotofísicas de excelência, designadamente elevado coeficiente de absorção, espectro de fluorescência intenso na região do visível, elevado rendimento quântico e fotoestabilidade. Estes têm sido utilizados na construção de quimiossensores fluorescentes capazes de detetar e quantificar com grande seletividade e precisão iões de metal de elevada importância biológica e ambiental, como são exemplo o Zn(II), Cu(II) e o Fe(III). Tradicionalmente um quimiossensor fluorescente é concebido de forma a incluir na sua estrutura um recetor (unidade quelante) responsável pela deteção do analito e um fluoróforo (molécula fluorescente) responsável pela sua sinalização. O rendimento quântico, a capacidade quelante do sensor químico e a sensibilidade são parâmetros fundamentais a ter em conta, a fim de se encontrar candidatos mais promissores.

A síntese de quimiossensores baseados em derivados de rodamina, funcionalizados com unidades quelantes do tipo catecol, foi o objetivo proposto para esta dissertação. Para se atingir esse objetivo propôs-se implementar metodologias mais sustentáveis e eficientes, recorrendo fundamentalmente ao uso de solventes menos poluentes como a água, no caso da síntese de rodamina, bem como o uso preferencial do aquecimento por radiação micro-ondas. A síntese destes quimiossensores envolveu o acoplamento amida da unidade quelante ao fluoróforo, utilizando-se para isso os pares de reagentes de acoplamento *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida/hidroxibenzotriazol na presença de *N,N*-diisopropiletilamina, sob aquecimento por micro-ondas, seguindo-se a remoção dos grupos protetores com BCl₃ em diclorometano.

Os compostos sintetizados ao longo do trabalho foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa, análise elementar e em alguns casos por difração de Raios-X de cristal único. Avaliaram-se as propriedades fotofísicas dos fluoróforos através da obtenção dos respetivos espectros de UV-Vis e fluorescência. Foram ainda realizados estudos de interação de alguns quimiossensores sintetizados com o ião de metal Fe(III).

Palavras-chave: Derivados de Rodamina, Catecol, Aquecimento por Micro-ondas, Acoplamento Amida, Quimiossensores, Espectroscopia de UV-Vis, Fluorescência, Deteção de Fe(III).

Abstract

The syntheses of new fluorescent compounds based on rhodamine derivatives have received special attention from the scientific community in recent years.

Rhodamine derivatives belong to the family of xanthene and are of great interest because they have excellent photophysical properties, such as high absorption coefficient, intense fluorescence spectrum in the visible region, high quantum yield and photostability. These compounds have been used to build fluorescent chemosensors able to detect and quantify with high precision and selectivity metal ions with biological and environmental importance, such as Zn(II), Cu(II) and Fe(III). Traditionally a fluorescent chemosensor is designed to include a receptor unit (chelate) responsible for detection of the analyte and a fluorophore (fluorescent molecule) responsible for signaling. The quantum yield, the chelating ability of the chemical sensor and the sensitivity are critical parameters to be taken into account in order to find the most promising candidates.

The purpose for this dissertation was the synthesis of chemosensors based on rhodamine derivatives, functionalized with catechol type chelating units. In order to achieve this objective it was proposed to implement more sustainable and efficient methods, using essentially less polluting solvents such as water, in the case of the synthesis of rhodamine, and using preferentially microwave heating.

The synthesis of these chemosensors involved the amide coupling of the fluorophore to the chelating unit, using the pairs of coupling reagents *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride/hydroxybenzotriazole in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine under microwave heating conditions, followed by removal of the protecting groups with BCl₃ in dichloromethane.

The compounds synthesized during this work were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry, elemental analysis and in some cases by single crystal X-ray diffraction. The photophysical properties of fluorophores were evaluated by obtaining the respective UV-Vis and fluorescence spectra.

Further studies have been also conducted to study the interaction of some synthesized chemosensors with the metal ion Fe(III).

Keywords: Rhodamine Derivatives, Catechol, Microwave Heating, Amide Coupling, Chemosensors, UV-Vis Spectroscopy, Fluorescence, Detection of Fe(III).

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice de Figuras	xvi
Índice de Tabelas	xix
Índice de Esquemas	xxi
Abreviaturas	xxiii

CAPÍTULO I

1. Introdução	3
1.1. Contextualização	3
1.2. Desenho de ligandos fluorescentes	3
1.2.1. O fluoróforo	6
1.2.2. Derivados de rodamina.....	10
1.3. O recetor	14
1.3.1. Poliaminas	15
1.3.2. Ácidos carboxílicos	15
1.3.3. Catecóis	16
1.3.4. Ácidos hidroxâmicos.....	16
1.3.5. Hidroxipiridinonas	17
1.4. Aplicações	18
1.4.1. Deteção de Ferro.....	18
1.4.2. Deteção de Cobre	21
1.4.3. Deteção de Zinco	22

CAPÍTULO II

2. Parte Experimental	29
2.1. Equipamentos e metodologias.....	29
2.2. Síntese de precursores.....	30
2.2.1. Síntese da rosamina 1	30
2.2.1.1. Método indireto	30
2.2.1.2. Método direto.....	31
2.2.2. Síntese da rosamina 2	32
2.2.3. Síntese da rosamina 3	33
2.2.4. Síntese de rosamina 4	34
2.2.5. Síntese de rodamina 5	35

2.2.6.	Síntese de 2,3-dibenziloxibenzaldeído 6	35
2.2.7.	Síntese de <i>terc</i> - butil-2,3-dibenziloxibenzilcarbamato 7	36
2.2.8.	Síntese de 2,3-dibenziloxibenzilamina 8	36
2.3.	Síntese de conjugados rodamina-catecol	37
2.3.1.	Síntese de 9	37
2.3.2.	Síntese de 10	38
2.3.3.	Síntese de 11	39
2.3.4.	Síntese de 12	39
2.3.5.	Síntese de 13	40
2.3.6.	Síntese de 14	41
2.3.7.	Síntese de 15	42
2.3.8.	Tentativa de preparação de complexos de Fe^{3+} e Cu^{2+}	43
2.4.	Estudo das propriedades fotofísicas	43
2.4.1.	Determinação de rendimentos quânticos	44
2.4.2.	Estudo da variação do espectro do UV-Vis com o pH e com a adição de Fe(III) ...	44
2.4.3.	Estudo da variação do espectro de fluorescência com a adição de Fe(III)	45

CAPÍTULO III

3.	Resultados e Discussão	49
3.1.	Considerações gerais	49
3.2.	Síntese de precursores	52
3.2.1.	Síntese de derivados de rodamina 1-5	54
3.2.2.	Síntese de catecolatos precursores 6-8	57
3.3.	Síntese de conjugados rodamina – catecol	58
3.3.1.	Síntese de conjugados 9-12	58
3.3.2.	Síntese de conjugados 13-15	60
3.3.3.	Tentativa de preparação de complexos de Fe^{3+} e Cu^{2+}	61
3.4.	Caraterização estrutural	62
3.4.1.	Caraterização estrutural dos precursores	62
3.4.2.	Caraterização estrutural de conjugados rodamina-catecol	66
3.4.3.	Espetrometria de massa	75
3.5.	Propriedades fotofísicas	76
3.5.1.	Espetroscopia de UV-Vis	76
3.5.2.	Propriedades espectroscópicas a diferentes valores de pH e interação com Fe^{3+} ..	77
3.5.3.	Fluorescência	81
3.6.	Difração de Raios-X de cristal único	84
3.7.	Aplicações	85
3.7.1.	Construção de um sensor	85

CAPÍTULO IV

4.	Conclusões	89
----	------------------	----

CAPÍTULO V

	Referências Bibliográficas	90
--	----------------------------------	----

Índice de Figuras

Figura 1.1. Complexação do ligando 9,10-bis[[[2-(dimetilamino)etil]metilamino]metil]antraceno com ZnCl_2 . ⁴	4
Figura 1.2. Complexação do grupo catecol em derivados do antraceno. ⁴	5
Figura 1.3. Esquema representativo dos vários tipos de quimiossensores fluorescentes. ⁵	6
Figura 1.4. $\epsilon \times \Phi / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em função do $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$, para diferentes fluoróforos. ³	10
Figura 1.5. Estrutura do anel xanteno e de derivados da família do xanteno.	11
Figura 1.6. Primeira etapa da síntese da rodamina B. ⁹	11
Figura 1.7. Segunda etapa da síntese da rodamina B. ⁹	12
Figura 1.8. Estrutura das aminas fenólicas (1-3) e de rosaminas bromo-substituídas (4-6).	13
Figura 1.9. Síntese combinatória de rosaminas. ¹⁵	14
Figura 1.10. Exemplo de dois sistemas de poliaminas.	15
Figura 1.11. Estrutura da Calceína-AM.	16
Figura 1.12. Estruturas de alguns sideróforos que ocorrem na natureza.	19
Figura 1.13. Exemplos de quimiossensores fluorescentes <i>Turn-OFF</i> para Fe(III) . ⁵	20
Figura 1.14. Exemplos de quimiossensores fluorescentes <i>Turn-ON</i> para Fe(III) .	20
Figura 1.15. Abertura do anel espirolactona por introdução do íão de metal. ²¹	20
Figura 1.16. Incorporação de Fe^{3+} na estrutura de um quimiossensor quimiométrico. ⁵	21
Figura 1.17. Síntese da rodamina B através do método desenvolvido por Czarnik. ²⁴	22
Figura 1.18. Formação do complexo de Cobre(II). ²⁶	22
Figura 1.19. Formação do complexo de zinco(II). ²⁶	23
Figura 1.20. Exemplos de quimiossensores <i>Turn-ON</i> para Zn(II) . ¹⁰	23
Figura 1.21. Derivados de rodamina 1-5 em estudo no presente trabalho.	24
Figura 1.22. Estrutura dos conjugados 10,12 e 15 em estudo.	25
Figura 2.1. Estrutura dos derivados de rodamina 1-5 .	30
Figura 3.1. Esquema representativo do método de aquecimento convencional.	50
Figura 3.2. Micro-ondas <i>CEM Discover</i> .	51
Figura 3.3. Espetros comparativos de RMN de ^1H . A - Rosamina 1.1 (em CDCl_3) e B – Rosamina 1 (em MeOD-d_4).	63
Figura 3.4. Espetros comparativos de RMN de ^1H da rosamina 3 , em CDCl_3 usando diferentes metodologias de síntese. Em A, hidrogenação usando atmosfera de hidrogénio à pressão de 5 bar durante 18 h, B – usando ciclohexeno na proporção 1:2, 100 W de potência máxima e temperatura de 100°C em MW, C – usando ciclohexeno na proporção 1:2, 50 W	

de potência máxima e temperatura de 130°C em MW, D - usando ciclohexeno na proporção 1:3, 50 W de potência máxima e temperatura de 130°C em MW.....	64
Figura 3.5. Espectro de RMN de ^1H , do precursor – 2,3-dibenziloxibenzilamina, em CDCl_3	66
Figura 3.6. Espectros comparativos de RMN de ^1H . A - conjugado 9 em CDCl_3 e B – conjugado 10 , em MeOD-d_4	67
Figura 3.7. Espectro de RMN de ^{13}C e respetiva expansão da zona aromática de 10 em MeOD-d_4	68
Figura 3.8. Espectro de COSY de 10 e respetiva expansão da zona aromática em MeOD-d_4 ..	69
Figura 3.9. Espectro de HSQC de 10 e respetiva expansão da zona aromática em MeOD-d_4 ..	70
Figura 3.10. Espectro de HMBC de 10 em MeOD-d_4	70
Figura 3.11. Espectro de RMN de ^1H parcial de 10 (A) e 12 (B), em DMSO-d_6	71
Figura 3.12. Função amida dos conjugados 10 (A) e 12 (B).....	72
Figura 3.13. Estabilidade de 10 ao longo do tempo em DMSO-d_6	74
Figura 3.14. Espectro de massa referente ao conjugado 10	75
Figura 3.15. Espectro de UV-Vis de 10 , numa gama de pH 2-12, em $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (10%) e 0,1 M de NaCl	78
Figura 3.16. Proposta de desprotonação para o conjugado 10	78
Figura 3.17. Espectro de UV-Vis de 10 comparando valores de pH 2-11 na presença e ausência de Fe(III) na razão 3:1 em $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (10%) e 0,1 M de NaCl	79
Figura 3.18. Imagem das alíquotas preparadas a diferentes pH com a adição de Fe(III) ao conjugado 10	79
Figura 3.19. Espectro de UV-Vis de 12 com e sem adições de ferro a pH entre 2-5 no solvente $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (10%) e 0,1 M de NaCl	80
Figura 3.20. Imagem das alíquotas preparadas entre valores de pH 2-12 com a adição de Fe(III) ao conjugado 12	80
Figura 3.21. Modelos de coordenação dos conjugados 10 (A) e 12 (B).....	81
Figura 3.22. Espectros de absorção e emissão normalizados de 10	82
Figura 3.23. Espectros de absorção e emissão normalizados de 12	83
Figura 3.24. (A) Representação gráfica da intensidade de fluorescência do conjugado 10 com a adição de quantidades crescentes de Fe(III) (2 μM , MOPS, pH 7,4, a 25°C, $\lambda_{\text{exc}} = 561 \text{ nm}$). Foram testadas as razões de metal: ligando de 10:1 - 1:3. (B) Intensidade máxima de emissão a $\lambda_{\text{em}} = 586 \text{ nm}$ em função das concentrações de Fe(III)	83
Figura 3.25. (a) Estrutura cristalina de Raios-X de 10 , (b) empacotamento de duas moléculas de 10 e (c) empacotamento cristalográfico de várias moléculas de 10 , onde a verde se representam os átomos de cloro.	84
Figura 3.26. Estrutura cristalina de Raios-X de 14	85

Figura 3.27. Amostras de rosaminas microcolunares em camadas de TiO_2 , com diferentes concentrações.	86
Figura 3.28. Espectro de emissão da rosamina 1 antes (A) e após incorporação com TiO_2 (B)..	86

Índice de Tabelas

Tabela 1. Aplicações e respetivas características de alguns compostos fluorescentes. ³	9
Tabela 2. Valores de pK_a para o ligando <i>N,N</i> -dimetil-2,3-dihidroxibenzamida.	16
Tabela 3. Valores de pK_a para o ligando ácido aceto-hidroxiâmico.	17
Tabela 4. Valores de pK_a para os ligandos de hidroxipiridinonas.	17
Tabela 5. Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de aquecimento.	52
Tabela 6. Resultados obtidos na síntese das rosaminas <i>para</i> substituídas	54
Tabela 7. Resultados obtidos na síntese da rosamina 3	55
Tabela 8. Resultados obtidos na síntese de 10 e 12 , com diferentes agentes de acoplamento.	59
Tabela 9. Desvios químicos (δ /ppm) dos sinais obtidos pelos espectros de RMN de ^1H das rosaminas 1-3	63
Tabela 10. Desvios químicos (δ /ppm) dos sinais obtidos pelos espectros de RMN de ^1H da 2,3-dibenziloxibenzilamina.	65
Tabela 11. Desvios químicos (δ /ppm) dos sinais obtidos nos espectros de RMN de ^1H dos conjugados 9-12	72
Tabela 12. Desvios químicos (δ /ppm) os sinais obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C dos conjugados 9-12	73
Tabela 13. Resultados obtidos por RMN de ^1H , para os conjugados 10 e 12 em DMSO- d_6 ao longo do tempo.	74
Tabela 14. Propriedades espectroscópicas de 1 , 3 , 10 e 12 em diferentes solventes a 25°C. E a determinação do coeficiente de absorção molar ϵ	77
Tabela 15. Propriedades espectroscópicas de fluorescência de 1 , 3 , 10 e 12 , em diferentes solventes a 25°C. Determinação de rendimentos quânticos ϕ_F	82

Índice de Esquemas

Esquema 3.1. Síntese das rosamina 1.1 , 1 e 2	53
Esquema 3.2. Síntese da rosamina 3 pelo método de hidrogenação.....	55
Esquema 3.3. Síntese da rosamina 4	56
Esquema 3.4. Síntese da rodamina 5	57
Esquema 3.5. Síntese do precursor – 2,3-dibenziloxibenzilamina 8	57
Esquema 3.6. Síntese dos conjugados 9 e 10 , usando o par de agentes de acoplamento EDC/HOBt.	59
Esquema 3.7. Síntese dos conjugados 11 e 12	60
Esquema 3.8. Desproteção dos grupos benzilo na unidade do catecolato com BCl ₃	60
Esquema 3.9. Síntese do conjugado 13	61
Esquema 3.10. Síntese dos conjugados 14 e 15	61

Abreviaturas

ADN - Ácido DesoxirriboNucleico

AE – Análise Elementar

CEMUP - Centro de Materiais da Universidade do Porto

CeNTI – Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes

COMU – hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminox)dimetilamino-morfolino-carbénio

COSY – correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional, (do Inglês *Correlation Spectroscopy*)

d – duplete

dd – duplo duplete

DIPEA- *N,N*-diisopropiletilamina

DMF – *N,N'*-dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DMT-MM – cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino

ϵ – absorvidade molar

EDC – hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

EM – Espetrometria de Massa

equiv – equivalentes

ESI - ionização por eletrospray (do Inglês *electrospray ionization*)

ESI-QTOF – ionização por eletrospray - quadropólo - tempo de voo (do Inglês *ElectroSpray Ionization Quadrupole Time Of Flight*)

EtOH – etanol

HMBC – correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância, bidimensional, (do Inglês *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy*)

HOBt – hidroxibenzotriazol

HRMS – espetrometria de alta resolução (do Inglês *High-resolution Mass Spectrometry*)

HSQC – correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional, (do Inglês *Heteronuclear single-Quantum Correlation Spectroscopy*)

IUPAC – União Internacional da Química Pura e Aplicada (do Inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

J – constante de acoplamento

$\lambda_{\text{máx}}$ – comprimento de onda para máximos de absorvância

λ_{em} – comprimento de onda para máximos de emissão

λ_{exc} – comprimento de onda de excitação

m – multiplete

M^{\bullet} – íão molecular

$(M+H)^+$ – íão molecular protonado

m/z – razão massa/carga

Me – grupo metilo

MOPS – ácido 3-[*N*-morfolino(propanosulfónico)]

MW – micro-ondas (do Inglês *microwaves*)

OBn – grupo benzilo

p-TsOH – ácido *para*-toluenosulfónico

ppm – partes por milhão

Pyr – piridina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de protão

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

δ – desvio químico

s – singleto

t – tripleto

TFA – ácido trifluoroacético

THF - tetrahidrofurano

TMS – tetrametilsilano

TLC – cromatografia de camada fina (do Inglês *Thin Layer Chromatography*)

UV-Vis – espectroscopia de ultravioleta-visível

Φ_F – rendimento quântico de fluorescência

CAPÍTULO I

Introdução

1.Introdução

1.1. Contextualização

O campo da química bioinorgânica viu grandes avanços na segunda metade do século passado, devido ao desenvolvimento de tecnologias que permitiram um estudo mais aprofundado das interações de íons de metal em sistemas biológicos. Esses estudos de interação com íons de metal são muito importantes uma vez que permitem compreender quais os estímulos que afetam a homeostase de metais, permitindo assim uma monitorização desses níveis no interior das células de forma a evitar inúmeras doenças que daí podem advir.¹

Entende-se por fluorescência de um composto a capacidade de este emitir luz quando exposto a uma radiação.² Existem porém outras definições como a apresentada por Lavis e Raines³ que a definem como sendo uma fração fluorescente composta por moléculas pequenas ou biomoléculas como proteínas e grânulos de semicondutores. Tendo em conta o processo fotofísico, ainda se pode definir fluorescência como um processo que envolve a absorção de um fóton pelo fluoróforo passando este para um estado excitado pela emissão de outro fóton, conduzindo assim à emissão de fluorescência.³

Existe um enorme interesse no desenvolvimento de sensores químicos uma vez que estes são utilizados como técnica analítica na determinação de substâncias de grande interesse para o ambiente, biologia e medicina. Os candidatos mais promissores são os sensores com base na fluorescência, devido essencialmente à sensibilidade e rapidez de resposta da técnica. A construção de sensores de fluorescência envolve o uso de um composto fluorescente, que é imobilizado num suporte polimérico sendo que esse material irá responder de forma reversível, à presença de uma determinada substância através de uma alteração na sua fluorescência. Deste modo, o desenvolvimento de sensores fluorescentes é complexo já que é necessário atender a alguns aspetos como a natureza do composto fluorescente, o reconhecimento molecular e a implementação no dispositivo de deteção. A síntese de compostos/ligandos fluorescentes, bem como o estudo do seu comportamento na presença de íons de metal de elevada importância biológica e ambiental, irão ter destaque nesta dissertação.

1.2. Desenho de ligandos fluorescentes

Os ligandos fluorescentes são caracterizados por possuírem elevada sensibilidade, rápida resposta e simplicidade do método de deteção. O conceito de ligando fluorescente, também designado por quimiossensor fluorescente, surgiu em 1994 por Czarnik⁴ e pressupõe o uso de compostos que possuam na sua composição um recetor - unidade quelante, um fluoróforo - unidade fluorescente e um mecanismo de comunicação entre os dois. A unidade quelante deve ter a capacidade de se ligar ou interagir com o analito (íons de metal). O sinal traduzido da

ligação fluoróforo - recetor - analito é muito importante uma vez que permite detetar e quantificar o analito alvo. Uma vez reconhecido o analito pelo recetor, o sinal de fluorescência pode ser observado por perda ou aumento de fluorescência ou desvio do máximo do comprimento de onda de emissão.⁵

Czarnik descreveu a síntese do ligando 9,10-bis[[[2-(dimetilamino)etil]metilamino]metil]antraceno e o estudo do seu comportamento na presença de ZnCl_2 , tendo verificado que o ligando em DMSO não apresentava fluorescência, enquanto que o correspondente complexo de Zn(II) (ver Figura 1.1) apresentava forte fluorescência. Neste caso, o antraceno corresponde à unidade fluorescente encontrando-se ligado covalentemente ao recetor do tipo 2-dimetil-1-metiletilenodiamina.⁴

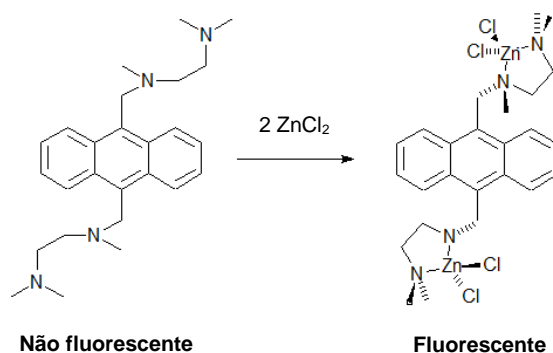


Figura 1.1. Complexação do ligando 9,10-bis[[[2-(dimetilamino)etil]metilamino]metil]antraceno com ZnCl_2 .⁴

Muitos outros trabalhos foram realizados pelo grupo de Czarnik tendo por base a unidade fluorescente do antraceno e explorando os mecanismos de ligação em meio aquoso. Com a introdução de ligandos poliazamacrocíclicos na posição 9 do anel do antraceno foi possível a complexação de iões de metais de transição em água, devido à inexistência da interferência de iões sódio, verificando-se que no caso da complexação com iões de metal Zn(II) e Cd(II) ocorre um aumento da fluorescência e na presença de Cu(II) e Hg(II) , uma diminuição desta. Outros ligandos foram ainda introduzidos na estrutura do antraceno, como a tioamida também na posição 9 do antraceno, sendo verificado um aumento de fluorescência na complexação com os iões de metal Hg(II) e Ag(I) .⁴

Foi verificado que as poliaminas derivadas do antraceno atuam como quimiossensores fluorescentes para aniões como fosfatos, sulfatos e acetatos, e ainda que a introdução de grupos catecol em derivados do antraceno, como se encontra representado na Figura 1.2, provocava a diminuição de fluorescência do composto após a introdução desse grupo.⁴

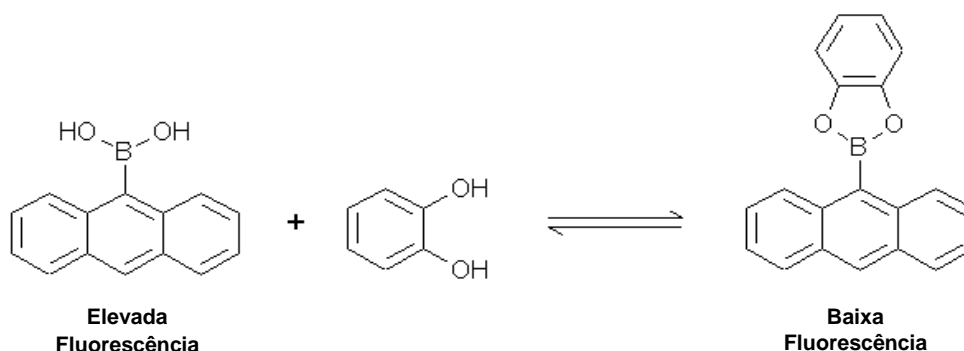


Figura 1.2. Complexação de grupo catecol em derivados do antraceno.⁴

O modelo clássico de construção de um quimiossensor fluorescente envolve a ligação de um recetor responsável pela deteção do analito a um fluoróforo responsável pela sua sinalização, podendo seguir três abordagens distintas: (i) *quimiossensores fluorescentes intrínsecos*, no qual o mecanismo de transdução do sinal envolve a interação do analito com um ligando que faz parte do sistema π do fluoróforo; (ii) *quimiossensores fluorescentes extrínsecos*, no qual o ligando é ligado covalentemente ao fluoróforo, contudo estes são eletronicamente independentes. Uma vez que a ligação covalente se faz através de um espaçador, ambas as unidades estão relativamente próximas, verificando-se que através da interação analito - ligando se induz alterações na sua fluorescência; e (iii) conjugados que se dissociam por adição de um analito, resultando numa resposta detetável pelo fluoróforo.²

Relativamente à resposta do quimiossensor, aqueles em que há extinção de fluorescência são também designados por *Turn-OFF* (Figura 1.3 a), enquanto que os que conduzem ao aumento de fluorescência são designados de *Turn-ON* (Figura 1.3 b). Os sensores de deteção de analitos alvo, que permitem a comparação ou determinação da razão da intensidade de fluorescência a dois comprimentos de onda diferentes, antes e depois da adição do analito são designados como sensores ratiométricos (Figura 1.3 c). Estes sensores apresentam como principais vantagens a minimização de alguns erros de medição devido a fatores como fotodegradação, concentração do sensor e efeitos ambientais. Por último, surge a classe de sensores quimiométricos, estes geralmente baseiam-se numa reação química específica e irreversível onde o sinal fluorescente também será afetado pela adição do analito (Figura 1.3d).⁵

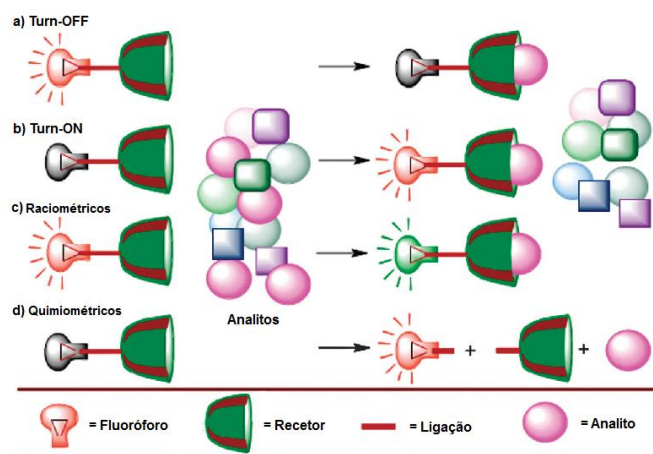


Figura 1.3. Esquema representativo dos vários tipos de quimiossensores fluorescentes.⁵

A perda/extinção da fluorescência (do Inglês *quenching*) ocorre numa grande variedade de complexos metálicos no qual o cruzamento de inter-sistemas proibidos tornam-se mais rápidos devido à presença de um ião de metal paramagnético na proximidade do fluoróforo. Este fenómeno é designado de efeito paramagnético e é a principal causa da extinção da fluorescência do complexo de Cu(II). Por essa razão os quimiossensores para Cu(II) e outros iões de metal paramagnéticos tais como, Fe(III), Cr(III) e Co(II) são geralmente baseados na perda de fluorescência.⁶

Após a síntese de um quimiossensor fluorescente é necessária a sua implementação num suporte sólido para assim ser possível a deteção. Os materiais mais usados como suporte sólido são os polímeros uma vez que são facilmente fabricados. O método mais simples de imobilização dos quimiossensores na matriz polimérica é através do acondicionamento físico. Porém este método produz materiais instáveis devido a perdas das propriedades como sensor o que limita o seu uso para períodos longos. Outro método muito utilizado é a imobilização do sensor recorrendo a fibras óticas. Os sensores de fibra ótica são constituídos por uma fibra ótica que possui numa das extremidades uma interface com um revestimento seletivo ou composto fluorescente imobilizado e na outra extremidade uma interface com um espectrómetro de emissão ótica, para aquisição de dados.⁷

1.2.1. O fluoróforo

Denomina-se por fluoróforo a molécula que imite fluorescência após a incidência de luz.⁸ Existem várias classes de moléculas que podem ser classificadas por essa denominação, de seguida são descritos brevemente os vários tipos de classes de fluoróforos existentes sendo estes também esquematizados na Tabela 1 e Figura 1.4.⁹

O primeiro fluoróforo identificado foi a *quinina* (1), este é um composto natural de vasta importância para a química medicinal e química orgânica. A primeira observação de fluorescência foi efetuada por Herschel, em 1845,³ tendo muitos desses fluoróforos apresentado aplicações em estudos biológicos, em especial no desenvolvimento de métodos de diagnóstico clínico.

Semelhantes à *quinina* encontram-se ainda os aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina (2), a tirosina (3) e o triptofano (4). A fenilalanina e a tirosina exibem fraca fluorescência sendo o triptofano o aminoácido natural que apresenta melhor capacidade de fluorescência, sendo muito usado em diversos processos, nomeadamente na visualização de proteínas.

Uma outra classe de fluoróforos são os compostos *aromáticos policíclicos*, amplamente usados na construção de quimiossensores e geralmente as propriedades espectrais exibidas correlacionam-se com o seu tamanho. Dentro desta classe destacam-se os derivados do naftaleno, como por exemplo 4-amino-3,6-disulfonilnaftalimidas, também designado por *Lucifer Yellow* (5) que apresenta uma absorvância a 428 nm.

As *Cumarinas* são outra classe de fluoróforos. A introdução de um heteroátomo na posição 7 da cumarina faz com que a molécula emita fluorescência. Um dos principais exemplos é a 7-hidroxi-4-metilcoumarina (4-MU, 6), esta exhibe propriedades fotofísicas muito interessantes em condições básicas.

De entre os *indóis* e *imidazóis*, destaca-se o 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI, 7) como sendo um fluoróforo capaz de se ligar ao DNA, sendo essa ligação acompanhada pelo aumento de fluorescência, podendo ser usado como marcador de DNA. Na classe dos imidazóis surge o "Hoechst 33342" (8), fluoróforo que apresenta como principal característica a permeabilidade celular adequada para ser usado nas células vivas. Este tipo de ligandos tal como o indole DAPI tem a capacidade de se ligar ao ADN e está a ser utilizado em microscopia de fluorescência.

O *NBD* - 4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazole (9) apresenta-se como sendo um composto heterocíclico que emite uma coloração verde em metanol. Este fluoróforo está a ser muito utilizado na preparação de sensores de lípidos.

A *Fluoresceína* (10) e seus derivados são dos fluoróforos mais conhecidos, sendo amplamente usados em estudos biológicos, bioquímicos e medicinais. Podem existir em várias formas, sendo as formas moleculares com maior interesse biológico as monoaniónicas e as dianiónicas. A forma dianiónica é a forma que exhibe maior fluorescência em solução aquosa. Na sua estrutura podem ainda ser inseridos grupos reativos, alterando assim algumas das propriedades exibidas, como por exemplo o caso da 2',7'-difluorofluoresceína na qual se verifica aumento da fotoestabilidade, mantendo porém as restantes propriedades fotofísicas. Uma das aplicações é na preparação de moléculas sensíveis ao pH para posterior aplicação em sensores. Esta classe de fluoróforos apresenta ainda um equilíbrio entre a forma fechada –

lactona e a forma aberta – forma quinóide. A acilação e alquilação dos grupos fenólicos permitem o fecho da molécula na sua forma não fluorescente – forma lactónica.

A *Rodamina* é uma outra classe importante de fluoróforos e que maior incidência tem em estudos já publicados. Algumas características importantes deste fluoróforo são a baixa sensibilidade ao pH e as propriedades espetrais ajustáveis. Dentro desta classe o composto mais simples é a rodamina 110 (**11**), destacando-se as suas excelentes propriedades fotofísicas em solução aquosa.

Os *Naftoxantenos* são estruturas semelhantes à fluoresceína e à rodamina, apresentando um anel benzénico adicional na estrutura do anel xanteno. Esta modificação permite verificar um desvio batocrómico nos comprimentos de onda de absorção e de emissão. Um dos exemplos clássicos é a naftofluoresceína (**12**) apresentando porém, sob condições básicas, propriedades de fluorescência modestas que comprometem a sua utilização.

As *Fenantridinas*, em particular o propídio (**13**), são amplamente usados como intercaladores de DNA, exibindo forte fluorescência quando ligados a ácidos nucleicos.

O *BODIPY*, do Inglês *boron difluoride dipyrromethene*, (**14**) é geralmente usado na construção de marcadores fluorescentes e sensores e apresenta propriedades fotofísicas semelhantes à fluoresceína em solução aquosa.

As *Cianinas*, apresentam na sua estrutura dois átomos de azoto ligados entre si por pontes metínicas, geralmente estão associadas a compostos de cor azul-verde. Um dos exemplos é a Cy3 (**15**).

As *Ftalocianinas* são macrociclos semelhantes às porfirinas. Ambos são constituídos por quatro subunidades pirrólicas ligadas entre si para formar um macrociclo aromático. As ftalocianinas são caracterizadas por possuírem propriedades de agregação e têm sido muito utilizadas como fotoestabilizantes. Um dos exemplos de maior sucesso é o designado de “IRDye 700DX” (**16**).

As *Oxazinas* substituídas são muito usados como fluoróforos. A resorufina (**17**) é um desses compostos que merece destaque.

Na Tabela 1, apresenta-se resumidamente alguns exemplos das diversas classes de compostos fluorescentes e suas principais características, acima discutidas.

Tabela 1. Aplicações e características de alguns compostos fluorescentes.³

Classes	Composto	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Φ_F	Aplicações
Aminoácidos	Triptofano	280	$6,3 \times 10^3$	348	0,13	Visualização do enrolamento de proteínas
Fluoresceína	Fluoresceína	490	$9,3 \times 10^4$	514	0,95	Diagnóstico clínico; marcação fluorescente de compostos biológicos; marcadores de segurança
Rodamina	Rhd 110	496	$7,4 \times 10^4$	517	0,92	Cosméticos; tintas para impressão; pigmento para indústria têxtil; marcação celular
Aromáticos Policíclicos	<i>Lucifer Yellow</i>	428	-	-	-	Processos biomoleculares; visualização do enrolamento do RNA
Cianinas	Cy3	554	$1,3 \times 10^5$	568	0,14	Potenciais sensores de membrana
Cumarinas	4-MU	360	$1,7 \times 10^3$	450	0,63	Medidor de atividade proteica
NBD	NBD-Cl	465	$2,2 \times 10^4$	535	0,30	Preparação de sensores de lípidos
Naftoxanteno	Naftofluoresceína	595	$4,4 \times 10^4$	660	0,14	Sensores de pH
Fenantridinas	Propídio	535	$5,4 \times 10^3$	617	0,13	Identificação de células mortas na membrana
BODIPY	BODIPY	505	$9,1 \times 10^4$	511	0,94	Marcadores fluorescentes e sensores; técnicas de polarização de fluorescência
Ftalocianinas	IRDye 700DX	689	$1,7 \times 10^5$	700	0,14	Fotoestabilizantes
Oxazinas	Resorufina	572	$5,6 \times 10^4$	585	0,74	Ensaio de viabilidade celular; conformação de proteínas; construção de sensores com finalidades ambientais

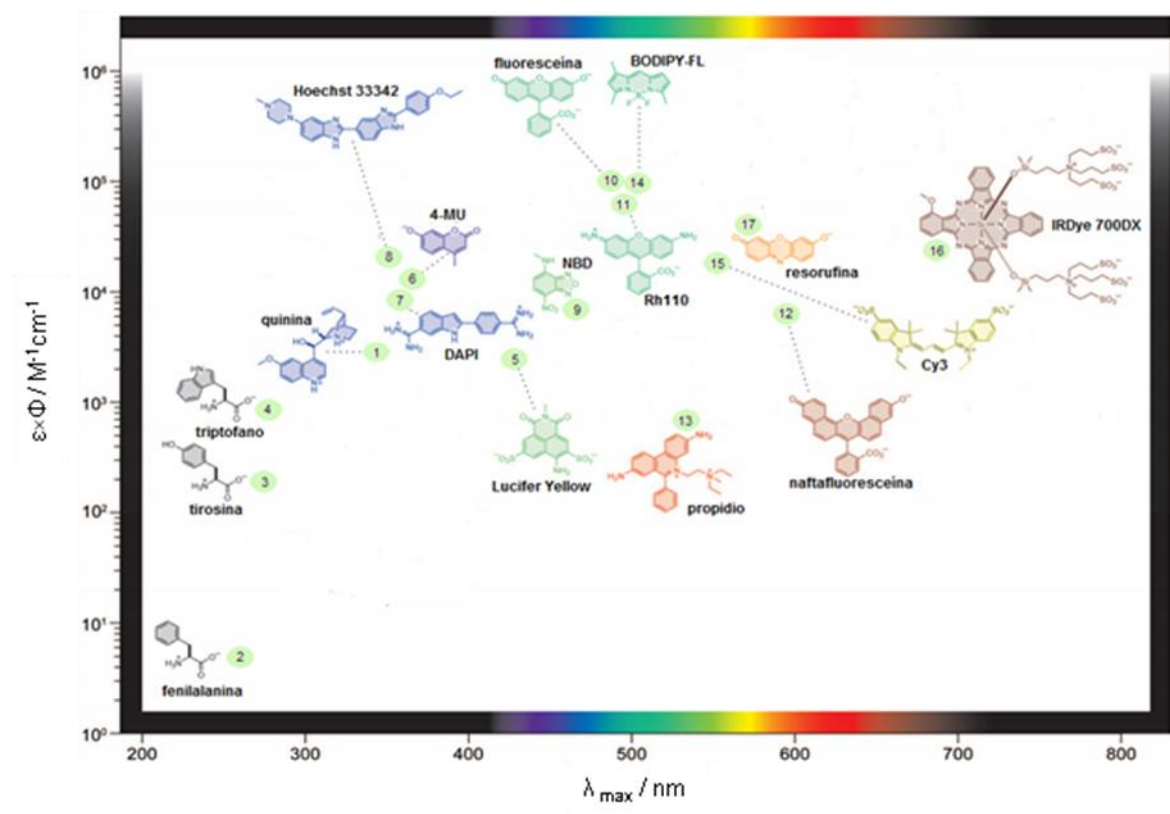


Figura 1.4. $\epsilon \times \Phi / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ em função do $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$, para diferentes fluoróforos.³

1.2.2. Derivados de rodamina

O xanteno é um composto orgânico heterocíclico de coloração amarela, pertencente à classe de compostos fluorescentes mais estudada devido às suas propriedades fotofísicas como rendimentos quânticos elevados, comprimentos de onda de emissão e absorção longos ($\lambda > 500 \text{ nm}$). Nesta classe incluem-se principalmente a fluoresceína e a rodamina, sendo que esta última e respetivos derivados são os mais utilizados e que maior relevância tiveram para o presente trabalho.³ A sua estrutura é numerada segundo as regras impostas pela IUPAC, conforme se apresenta na Figura 1.5.

A utilização destes compostos tem vindo a crescer e cada vez mais é uma área a investir por parte da comunidade científica. Têm uma vasta área de aplicações como por exemplo: em biologia para sensores fluorescentes de iões de metal¹⁰; em medicina no desenvolvimento de sensores com capacidade de intervir em diagnósticos clínicos e em análises forenses³; na deteção de iões de metal em amostras alimentares^{11,12}; e no ambiente para sensores de gases.¹³

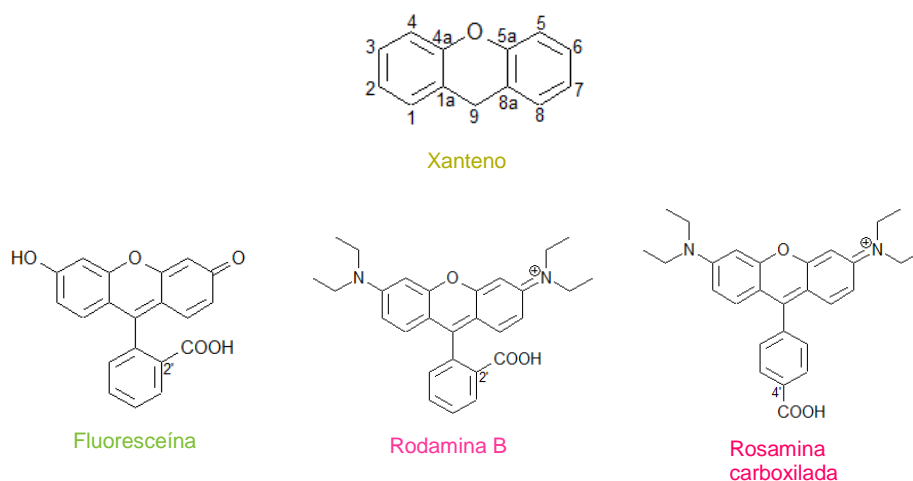


Figura 1.5. Estrutura do anel xanteno e de derivados da família do xanteno.

A metodologia de síntese mais usual de derivados de fluoresceína e rodamina recorre a reações de substituição aromática eletrófila. No caso da síntese da rodamina B⁹, esta envolve a reação de anidrido ftálico e 3-dietilaminofenol em meio ácido, e ocorre em duas etapas.

Etapa 1

Na primeira etapa – acilação de Friedel-Craft, é formado o catião acilo através da protonação do átomo de oxigénio do anidrido ftálico em meio ácido. Esse catião acilo irá reagir com 3-dietilaminofenol, levando à formação de uma benzofenona (ver Figura 1.6).

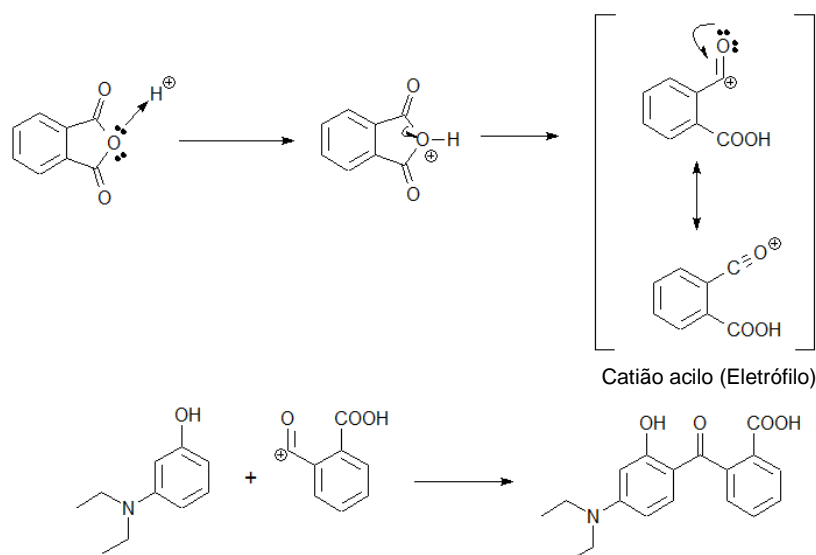


Figura 1.6. Primeira etapa da síntese da rodamina B.⁹

Etapa 2

A benzofenona resultante da primeira etapa é protonada para formar um intermediário catiónico que irá sofrer novo ataque do 3-dietilaminofenol. O átomo de oxigénio adjacente ao anel aromático ataca nucleofilicamente o catião acilo gerando uma nova ligação entre os dois anéis aromáticos. Por último ocorrem desidratações, rearranjando-se o anel aromático e formando-se a rodamina B.

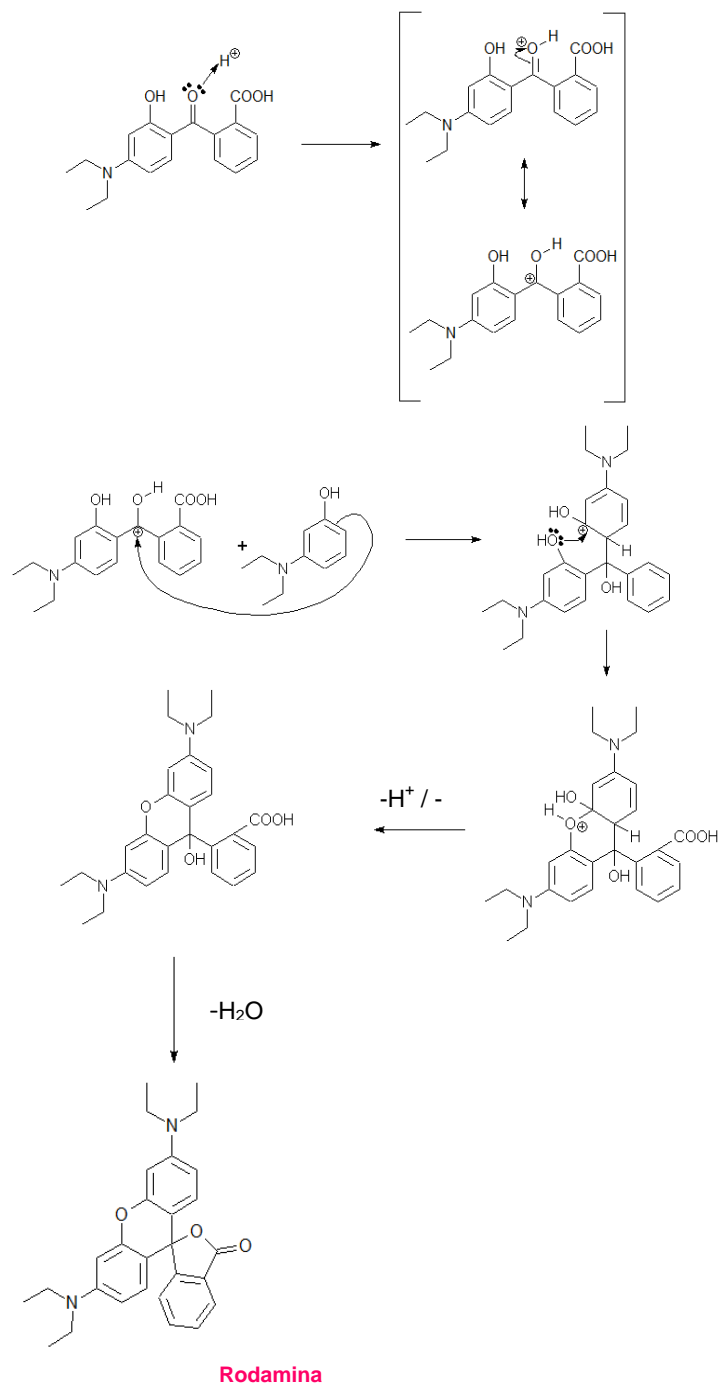


Figura 1.7. Segunda etapa da síntese da rodamina B.⁹

As rosaminas, dado não possuírem o grupo ácido carboxílico na posição 2', seguem uma rota de síntese semelhante à rodamina B, mas são obtidas por reação com aldeídos aromáticos em vez do anidrido ftálico. Deste modo, Kevin Burgess e seus colaboradores realizaram a síntese de rosaminas bromo-substituídas¹⁴, através de reações de substituição aromática eletrófila usando 4-bromobenzaldeído com aminas fenólicas (ver Figura 1.8, **1-3**), em ácido sulfúrico (60%), seguidas de um passo de oxidação, usando como reagente o cloranil. Os resultados obtidos utilizando dois tipos de aquecimento – micro-ondas e convencional, mostraram que através do aquecimento por micro-ondas as reações são mais rápidas, passando de horas a alguns minutos e a quantidade de composto obtido também é superior. Verificaram ainda que, no caso da rosamina **6**, a síntese foi favorecida quando se efetuou o aumento da temperatura de 90°C para 150°C, com rendimentos de 38% e 73%, respetivamente, e com diminuição do tempo de reação de 30 min (convencional) para 10 min (micro-ondas), concluindo-se assim que o aumento da temperatura também tem um papel preponderante nos resultados obtidos.

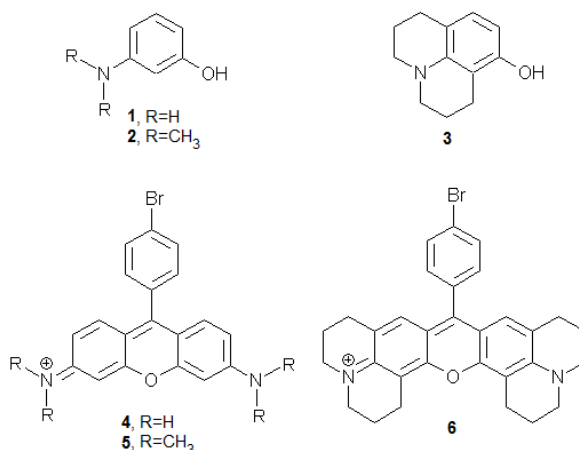


Figura 1.8. Estrutura das aminas fenólicas (**1-3**) e de rosaminas bromo-substituídas (**4-6**).

Em alternativa, as rosaminas, podem ainda ser preparadas via síntese de xantonas, seguida de reação com reagente de Grignard. Na Figura 1.9 é apresentado o processo de síntese de rosaminas em fase sólida reportadas por Young-Hoon Ahn e seus colaboradores.¹⁵ A metodologia de síntese envolve a preparação de vários derivados da 3-amino-6-nitro-9*H*-xantona, seguida por ligação a uma resina de cloreto de 2-clorotritilo e reação com vários reagentes de Grignard diferentes. A clivagem ácida da resina resulta na desidratação originando os derivados de rosamina.

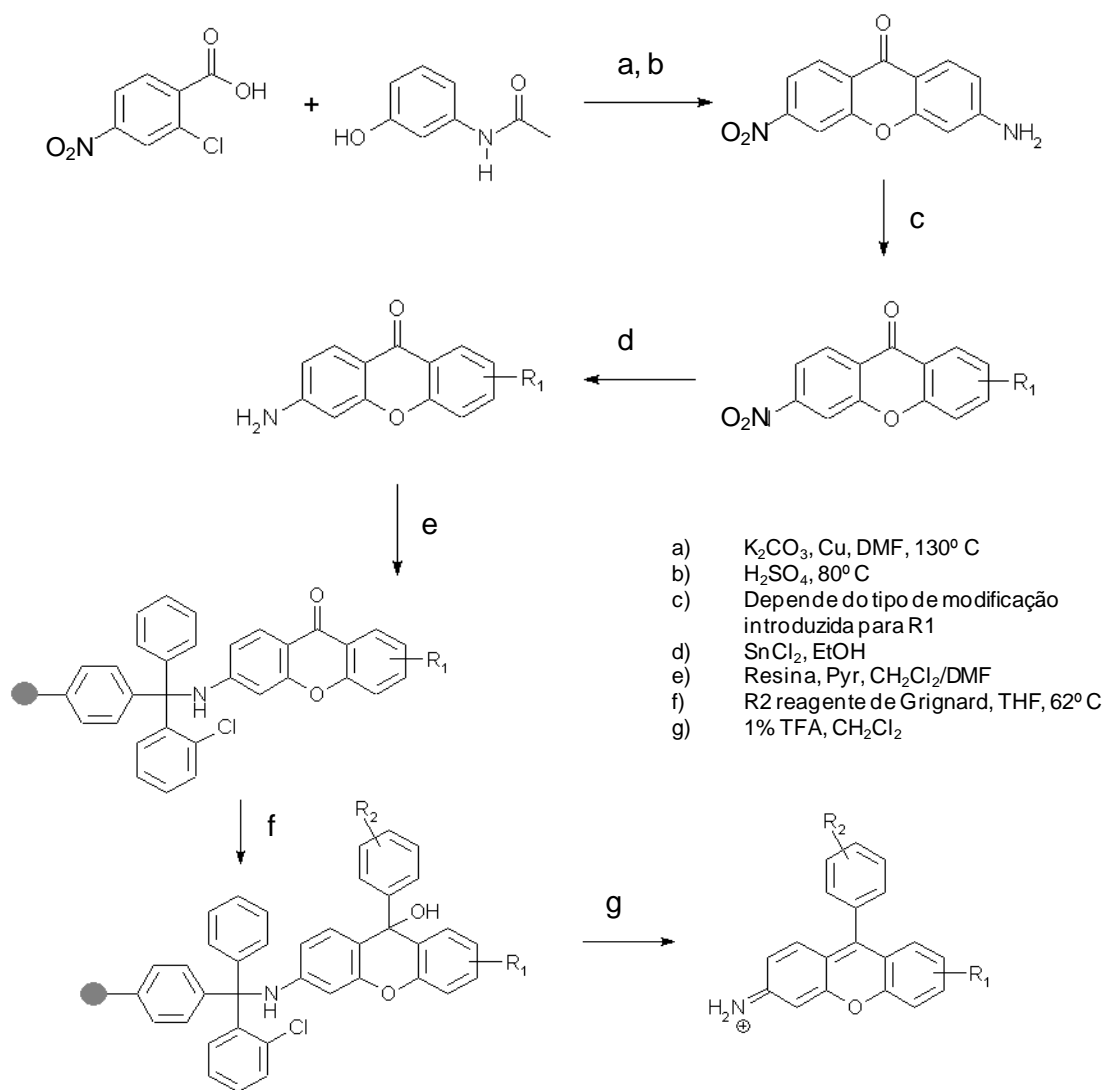


Figura 1.9. Síntese combinatória de rosaminas.¹⁵

Apesar destes avanços nos métodos de síntese de derivados de rosaminas, a procura de metodologias mais sustentáveis constitui um verdadeiro desafio para a Química Orgânica.

1.3. O recetor

A unidade recetora constitui uma função importante do quimiossensor uma vez que é a responsável pela interação/coordenação ao analito/ião de metal. As unidades recetoras capazes de coordenar com iões de metal podem ser do tipo: poliaminas, poliéteres, polissulfuretos, ácidos carboxílicos, ácidos hidroxâmicos, que podem adquirir topologias em cadeia aberta ou em macrociclos. A escolha do recetor depende essencialmente do ião de metal que se pretende detetar. Dado que um dos principais objetivos deste trabalho consiste na

síntese de ligandos fluorescentes sensíveis ao Fe(III), de seguida são apresentados alguns dos recetores que possuem maior afinidade para este ião de metal.

1.3.1. Poliaminas

A presença de poliaminas como recetores nas estruturas dos quimiossensores confere-lhes solubilidade em água, como resultado da sua protonação. Além disso as poliaminas proporcionam uma grande versatilidade de aplicações ao quimiossensor, uma vez que as suas propriedades podem ser moduladas, numa grande extensão, pelo pH do sistema. A protonação da unidade de poliamina a valores de pH ácidos conduz à formação de um sensor de anião, enquanto que a pH básico as formas não protonada são ideais para formar complexos estáveis de iões de metal.

Como exemplo apresentam-se dois sistemas de poliaminas, representados na Figura 1.10. Nestes sistemas, as cadeias de poliaminas proporcionam a ocorrência de mecanismos de transferência eletrónica que vão ser responsáveis pelas propriedades fotofísicas do quimiossensor.¹⁶

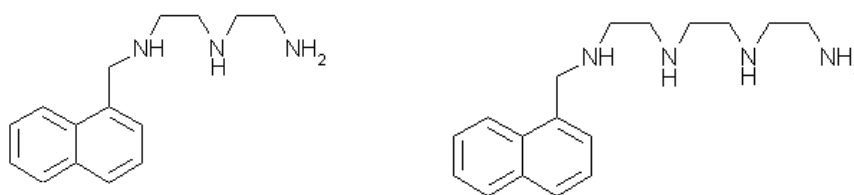


Figura 1.10. Exemplo de dois sistemas de poliaminas.

1.3.2. Ácidos carboxílicos

Um dos exemplos de ligandos com ácidos carboxílicos que merece maior destaque é o derivado da fluoresceína - a calceína-AM (éster acetoximetilo de calceína), representada na Figura 1.11. A síntese deste ligando surgiu da necessidade de estudar os locais de acumulação de ferro de forma não destrutiva, sendo ainda atualmente usado como método de eleição. A calceína-AM é hidrolisada por esterases intracelulares para calceína, que posteriormente liga ao ferro, verificando-se uma alteração na fluorescência por perda desta, possibilitando assim o cálculo da concentração total de ferro. Uma das desvantagens deste fluoróforo e seus análogos¹⁷ é o facto de serem pouco sensíveis aos estados de oxidação do ferro, Fe(II)/Fe(III) exigindo a subsequente adição de um agente quelante para a sua quantificação, o que impede a sua utilização em tempo real.¹

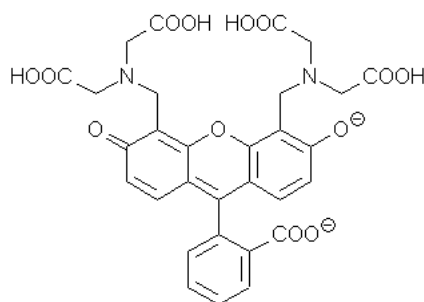


Figura 1.11. Estrutura da Calceína-AM.

1.3.3. Catecóis

Os ligandos do tipo catecol possuem elevada afinidade para o Fe(III). A interação com o catião do metal tripositivo resulta da elevada densidade de eletrões de ambos os átomos de oxigénio. No entanto essa elevada densidade de carga está também associada à elevada afinidade para protões (ver Tabela 2). Os ligandos baseados no catecol são ainda suscetíveis de sofrer processos oxidativos.

Tabela 2. Valores de pK_a para o ligando *N,N*-dimetil-2,3-dihidroxibenzamida.¹⁸

Ligando	Estrutura	pK_{a1}	pK_{a2}
<i>N,N</i> -dimetil-2,3-dihidroxibenzamida (DMB)		8,4	12,1

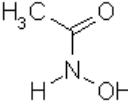
Dada a importância que as unidades do tipo catecol apresentam no desenvolvimento deste trabalho, as suas propriedades integradas na construção de ligandos sensíveis ao Fe(III) vão ser discutidas mais adiante.

1.3.4. Ácidos hidroxâmicos

Os ácidos hidroxâmicos possuem uma afinidade mais baixa para o Fe(III) do que o ligando catecol, mas quanto à seletividade, estes ligandos, tal como o catecol, favorecem a formação de catiões tribásicos. Devido à constante de protonação ser relativamente baixa ($pK_a \sim 9$), a interferência do hidrogénio a pH fisiológico é menos pronunciada do que nos ligandos do tipo catecol, consequentemente o complexo 3:1 é o predominante a pH 7,0. No entanto, a afinidade de um ligando hidroxamato bidentado para ferro é insuficiente para o solubilizar a pH 7,4, sendo só os hidroxamatos tetradentados e hexadentados suscetíveis de serem captadores de

Fe(III) em condições fisiológicas. Na Tabela 3 encontra-se apresentado um exemplo de um ligando desta classe.

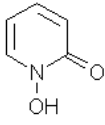
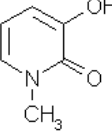
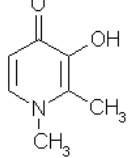
Tabela 3. Valores de pK_a para o ligando ácido aceto-hidroxâmico.¹⁸

Ligando	Estrutura	pK_{a1}	pK_{a2}
Ácido aceto-hidroxâmico		-	9,4

1.3.5. Hidroxipiridinonas

Os ligandos do tipo hidroxipiridinona (HPO) combinam as características dos ácidos hidroxâmicos e dos grupos catecol formando anéis de cinco lados por coordenação do metal a dois átomos de oxigénio da hidroxipiridinona. A afinidade destes ligandos para o Fe(III) é refletida nos seus valores de pK_a , sendo que uma maior afinidade de ferro(III) apresenta um valor de pK_a mais elevado. Existem três classes de ligandos HPO, 1,2-hidroxipiridinona (1,2-HPO); 2,3-hidroxipiridinona (2,3-HPO) e 3,4-hidroxipiridinona (3,4-HPO). Dentro destas três classes a que apresenta maior afinidade para Fe(III) é a 3,4-HPO, uma vez que apresenta maiores valores de pK_a , resultando estes valores da deslocalização do único par de eletrões associado ao átomo de azoto do anel aromático ao grupo carbonilo. Na Tabela 4 apresentam-se as referidas hidroxipiridinonas e seus respetivos pK_a .¹⁸

Tabela 4. Valores de pK_a para os ligandos de hidroxipiridinonas.¹⁸

Ligando	Estrutura	pK_{a1}	pK_{a2}
1,2-hidroxipiridinona (1,2-HPO)		-	5,8
2,3-hidroxipiridinona (2,3-HPO)		0,2	8,6
3,4-hidroxipiridinona (3,4-HPO)		3,6	9,9

1.4. Aplicações

A utilização de ligandos fluorescentes é cada vez maior e abrange diversas áreas como o ambiente, a biologia, as indústrias farmacêuticas e alimentar. A nível ambiental é de destacar a monitorização de gases como o CO_2 e o NH_3 ; em biologia a localização de proteínas em células vivas; na medicina a nível do desenvolvimento de métodos de diagnóstico médico e análises forenses, e na indústria alimentar no controlo de alimentos.

Existem alguns fatores a ter em consideração no *design* e fabrico destes ligandos como a necessidade de desenvolver ligandos fluorescentes que permitam a deteção *in situ* e em tempo real do analito, com elevada precisão e sensibilidade e que permitam a quantificação do analito a baixos custos.

De seguida serão discutidos alguns exemplos de ligandos fluorescentes usados na deteção dos iões de metal Fe(III) , Zn(II) e Cu(II) .

1.4.1. Deteção de Ferro

Nos últimos anos, os sensores fluorescentes têm merecido grande destaque no desenvolvimento de métodos analíticos para a deteção de ferro. O ferro é um dos elementos mais importantes nos processos metabólicos e é indispensável ao funcionamento vital dos sistemas vivos. O ferro participa no transporte de oxigénio para as células, no entanto quando está em deficiência ou excesso, o ferro pode ser prejudicial podendo causar distúrbios, conduzindo a estados nocivos para a saúde como o surgimento de doenças, sendo uma das mais comuns a anemia. As formas de ferro mais abundantes na natureza são apresentadas nos estados de oxidação $2+$ e $3+$, sendo a forma Fe^{3+} a predominante, encontrando-se esta sob a forma de um hidróxido insolúvel - $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ a pH fisiológico ($\text{pH}=7,4$) e a solubilidade de 10^{-18} M. Na natureza a aquisição de ferro não está disponível e os microrganismos tiveram de arranjar estratégias que permitissem essa captação e ao mesmo tempo protegerem-se de eventuais efeitos tóxicos causados pelo ferro. Este problema foi resolvido recorrendo a *sideróforos*.^{5,19}

Siderofóros (do Grego “transportadores de ferro”) são definidos como moléculas que apresentam pesos moleculares relativamente baixos (400-2000 M), elevada afinidade para a coordenação ao Fe(III) na sua estrutura, podendo ser considerados como promotores do crescimento de microrganismos. São largamente produzidos por espécies aeróbicas e em casos especiais também por espécies anaeróbicas. Existem mais de 300 sideróforos naturais, e são apresentados alguns exemplos na Figura 1.12.⁵ Na sua constituição quase todos os sideróforos contêm pelo menos um grupo hidroxamato, um catecol e ou um α -hidroxicarboxilato

como locais de coordenação ao ferro. Um aspeto comum a todos os sideróforos é o facto de, no local de ligação ligando-metal, se formarem anéis de cinco lados muito estáveis com o Fe(III).

Em 1911, Neilands e Pollock descobriram que todas as micobactérias precisavam de uma substância essencial que era fundamental ao seu crescimento. Cerca de quarenta anos mais tarde (1949-1952), foi possível isolar essa substância designando-se por Micobactina (Figura 1.12). A sua estrutura foi caracterizada identificando-se como locais de coordenação ao metal dois hidroxamatos e uma 2-hidroxifeniloxazolina. Em 1970, o primeiro tricatelato foi isolado por Neilands e Pollock a partir da *Salmonella Typhimurium* e por O'Brien e Gibson através da *Escherichia coli*, o que levou a que estes dois grupos de investigadores lhes atribuíssem nomes distintos, enterobactina e enteroquelina, respetivamente.²⁰

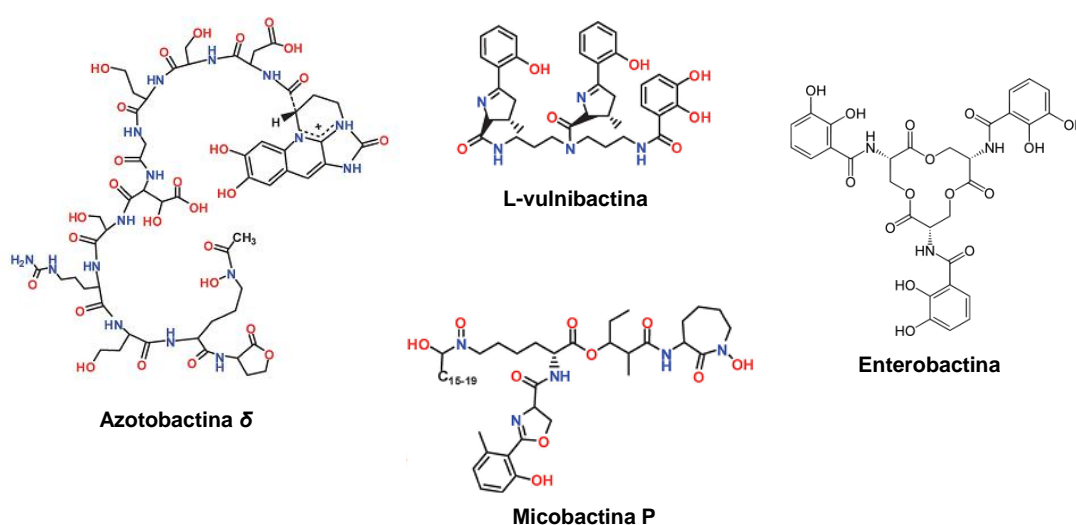


Figura 1.12. Estruturas de alguns sideróforos que ocorrem na natureza.

Inspirados nestes sideróforos, nos últimos anos têm sido preparados diversos quimiossensores fluorescentes para deteção seletiva de Fe(III). De seguida encontram-se representados alguns exemplos de quimiossensores de Fe(III) sintetizados a nível laboratorial para cada categoria mencionada.

Na Figura 1.13, apresentam-se dois exemplos de quimiossensores *Turn-OFF* com derivados de fluoresceína que permitem a deteção do ião de metal Fe(III) por perda de fluorescência.

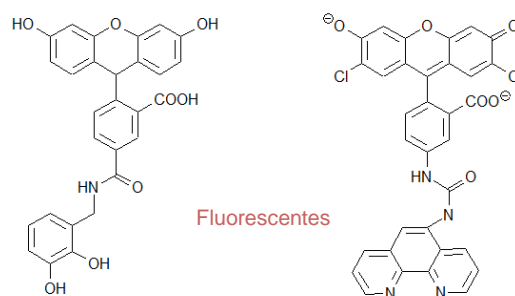


Figura 1.13. Exemplos de quimiossensores fluorescentes *Turn-OFF* para Fe(III).⁵

Na Figura 1.14 encontram-se ilustrados três quimiossensores *Turn-ON* de detecção de Fe(III) derivados da rodamina B, sendo estes derivados muito utilizados no *design* de sensores. O grupo carboxílico pode facilmente reagir com aminas, hidrazinas ou derivados de oxima, dando origem a ligandos com elevada afinidade ao íão de metal. O comportamento de fluorescência de derivados da rodamina B é devido a uma alteração reversível na sua estrutura, passando de não fluorescente para fluorescente por abertura do anel espirocíclico na presença do íão de metal (ver Figura 1.15).^{5,21}

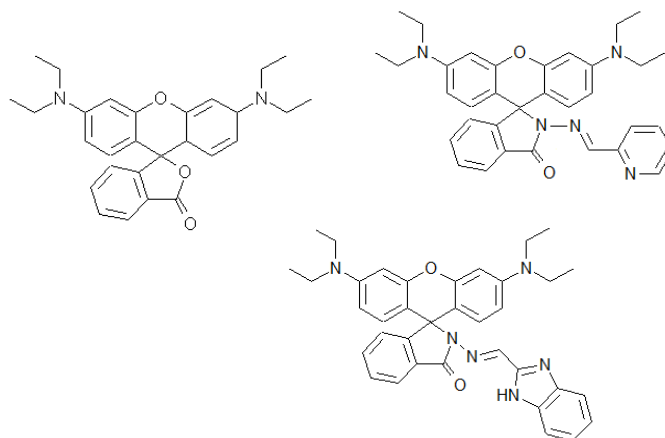


Figura 1.14. Exemplos de quimiossensores fluorescentes *Turn-ON* para Fe(III).

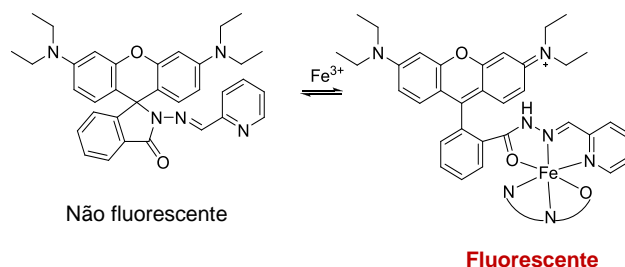


Figura 1.15. Abertura do anel espirolactona por introdução do íão de metal.²¹

Kim e seus colaboradores²² desenvolveram um quimiossensor quimiométrico (ver Figura 1.16) baseado em derivados da rodamina, no qual se observou alteração na sua fluorescência provocada pela adição de um íon de metal - Fe(III) sendo esta alteração também verificada para outros cátions de metal. Inicialmente o composto apresentava uma banda de absorção a 400 nm, mas após a adição do íon de metal em solução aquosa surge uma banda de absorção a 526 nm e uma de emissão a 551 nm, correspondente esta última à abertura do anel espirocíclico. A resposta do sensor ao Fe(III) envolve uma reação química irreversível no qual o mecanismo da reação compreende a hidrólise da ligação imina do fluoróforo inicial levando à formação de dois produtos, um aldeído e uma amina, sendo a amina a responsável pela coordenação do íon de metal.

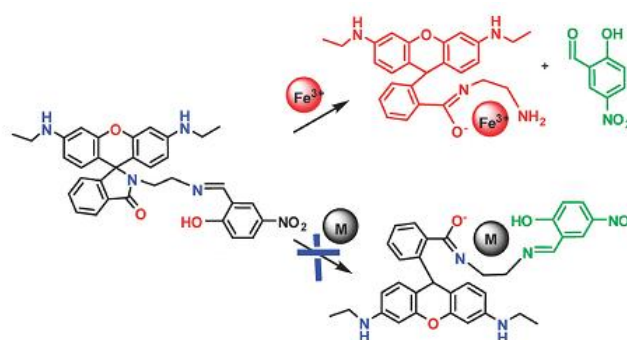


Figura 1.16. Incorporação de Fe³⁺ na estrutura de um quimiossensor quimiométrico.⁵

1.4.2. Detecção de Cobre

O cobre é um elemento fundamental para todos os organismos vivos devido às suas capacidades redox e atividades enzimáticas. A sua ingestão em défice ou em excesso, pode provocar nos seres vivos várias patologias como por exemplo, problemas renais e hepáticos.²³ Tal como no caso do ferro existe necessidade de implementar cada vez mais métodos de monitorização eficientes, rápidos, sensíveis e económicos para o Cu(II). A rodamina B e a reação de abertura do anel espirocíclico mereceram um particular interesse em 1997 por Czarnik e os seus colaboradores, sendo estes responsáveis pelo estudo pioneiro, no qual foi usada uma rodamina B hidrazida como sensor fluorescente para o Cu²⁺. A partir deste trabalho muitos outros foram desenvolvidos e publicados tendo por base este único processo de abertura do anel.²⁴ Na 1.17 encontra-se esquematizada a reação de abertura do anel espirolactona, bem como a introdução do íon de metal Cu²⁺ na sua estrutura sendo ainda possível visualizar a alteração da fluorescência após abertura do anel, passando de não fluorescente para fluorescente. Todavia muitos outros sensores já foram desenvolvidos, sendo uma área em grande progresso.^{23,25,26}

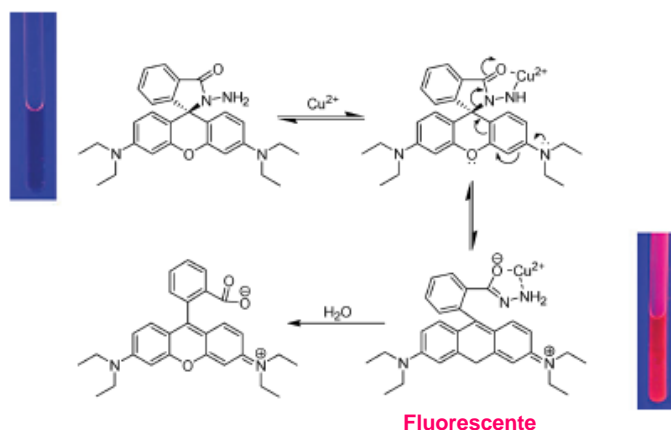


Figura 1.17. Síntese da rodamina B através do método desenvolvido por Czarnik.²⁴

Na Figura 1.18 é apresentado o primeiro exemplo de um quimiossensor fluorescente para Cu(II) desenvolvido por Tong e seus colaboradores, usando uma hidrazona derivada da rodamina, obtida por reação de rodamina B e hidrato de hidrazina, seguindo-se adição de salicilaldeído. Verificaram que ao adicionar o íon de metal na proporção de 1:1 (metal - ligando) o anel espirocíclico abre levando à formação do complexo. A absorvância e a emissão de fluorescência obtidas foram acima de 500 nm numa solução tampão neutra, sendo possível detetar o íon de metal numa concentração abaixo dos micromolar.²⁶

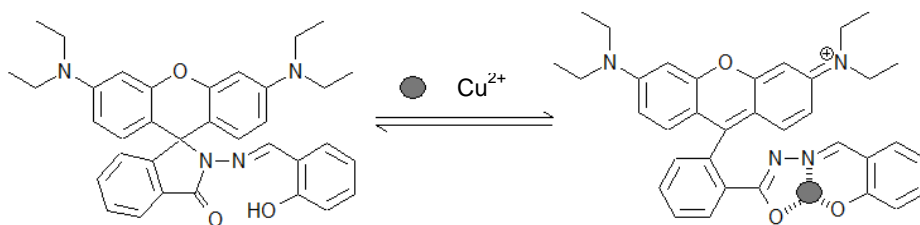


Figura 1.18. Formação do complexo de Cobre(II).²⁶

1.4.3. Detecção de Zinco

O zinco é um elemento essencial para a sustentabilidade de todas as formas de vida, sendo este o segundo metal de transição mais abundante no organismo humano e encontra-se predominantemente na forma divalente em ambientes biológicos.¹⁰ Muitas enzimas presentes no nosso organismo, bem como no oceano contêm zinco como elemento essencial. Vários processos patológicos como a doença de Alzheimer envolvem a presença de íões de zinco no

meio intracelular. Deste modo, a deteção e quantificação de Zn(II) intracelular poderá ajudar a prevenir a incidência deste tipo de doenças. Mashraqui e seus colaboradores sintetizaram um quimiossensor fluorescente derivado da rodamina, capaz de detetar concentrações micromolares de Zn(II) verificando a alteração de cor da solução de incolor para laranja e do desvio do máximo de absorção do comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}} = 302 \text{ nm}$ para $\lambda_{\text{máx}} = 528 \text{ nm}$, respetivamente). A deteção também foi verificada como válida para outros catiões como é o caso do Li^+ , Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} . Na Figura 1.19 encontra-se esquematizada a reação de abertura do anel espirocíclico por coordenação ao Zn(II).²⁶

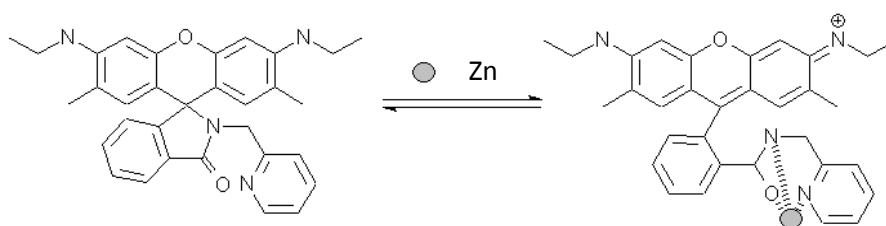


Figura 1.19. Formação do complexo de zinco(II).²⁶

Também o laboratório de Lippard produziu vários sensores com capacidades fluorescentes derivados da fluoresceína que complexam com o ião metálico Zn(II), como é o caso dos quimiossensores designados por Zinpyr-1, ZnAF-1F, Zinspy-5 e Quinozin-1 (ver Figura 1.20).¹⁰

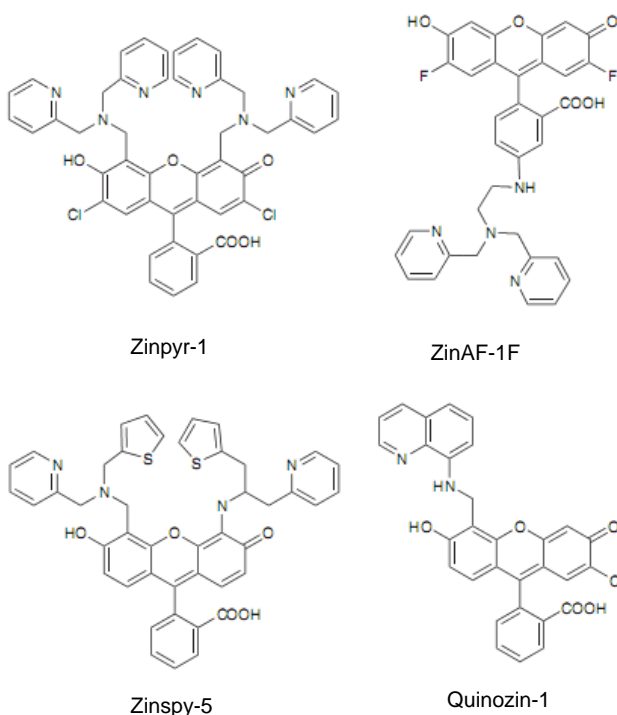


Figura 1.20. Exemplos de quimiossensores *Turn-ON* para Zn(II).¹⁰

O trabalho proposto teve como principal objetivo a síntese de novos derivados de rosaminas fluorescentes e o estudo da sua afinidade para iões de metal com relevância biológica, como é exemplo o Fe(III), de modo a poderem vir a ser usados no diagnóstico e tratamento de situações clínicas relacionadas com estes iões de metal ou para aplicações ambientais.

Este trabalho enquadra-se no âmbito de projetos que temos vindo a desenvolver na síntese e caracterização estrutural de novas sondas fluorescentes para iões de metal.²⁸ Nesse sentido este programa contemplou a seguinte ordem de trabalhos:

a) Síntese de rosaminas precursoras **1** e **2** (Figura 1.21), substituídas na posição 4' com grupos carboxilato e nitro respetivamente, recorrendo à reação de condensação de benzaldeído *p*-substituído e 3-dietilaminofenol, seguindo-se oxidação com cloranil. A rosamina **2** foi ainda convertida em rosamina **3** (Figura 1.21), por redução do grupo nitro a grupo amino, testando-se várias metodologias de redução. Foram ainda preparados os derivados **4** e **5**. As rosaminas foram sintetizadas recorrendo fundamentalmente a metodologias de síntese mais sustentáveis como o uso do aquecimento por micro-ondas em combinação com a utilização de solventes menos poluentes como a água.

b) A reação de acoplamento amida das rosaminas 4'-substituídas **1** e **3** a unidades quelantes do tipo catecol foi levada a cabo utilizando diferentes agentes de acoplamento. A etapa final de remoção dos grupos protetores das unidades catecolato foi realizada na presença duma mistura de BCl₃ em diclorometano, resultando na obtenção dos conjugados **10** e **12** (Figura 1.22).

c) Foi ainda preparado o conjugado **15**, que resultou da reação de acoplamento da rodamina comercial, 5(6)-carboxitetrametilrodamina (mistura de isómeros) à unidade de catecol, seguindo-se hidrogenação catalisada pelo Pd/C.

d) Os derivados de rodamina e respetivos conjugados rodamina-catecol foram caracterizados por análise elementar, espetrometria de massa, espetroscopia de ressonância magnética nuclear, espetroscopia de UV-Vis e fluorescência. Os compostos **10** e **14** (isómero 4') foram ainda caracterizados recorrendo à técnica de difração de Raios-X de cristal único.

e) Estudos de interação com Fe(III).

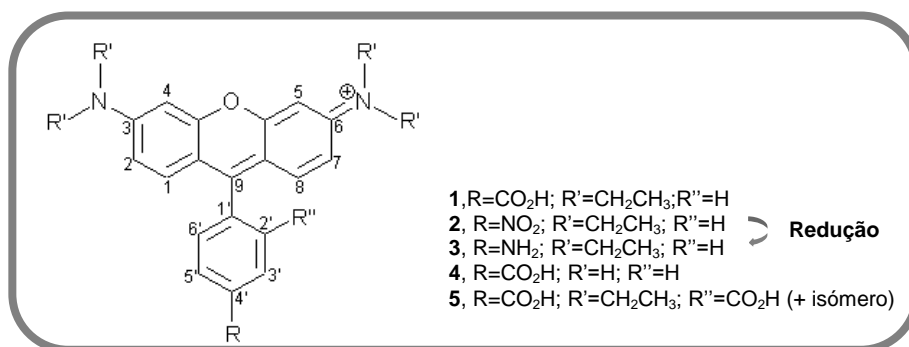


Figura 1.21. Derivados de rodamina 1-5 em estudo no presente trabalho.

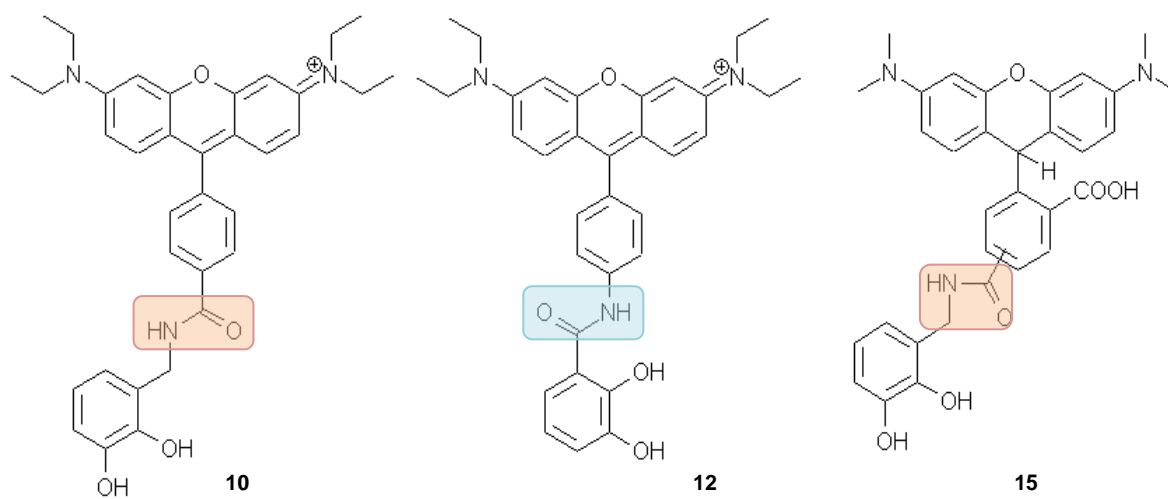


Figura 1.22. Estrutura dos conjugados 10,12 e 15 em estudo.

CAPÍTULO II

Parte Experimental

2. Parte Experimental

2.1. Equipamentos e metodologias

As pesagens dos reagentes foram realizadas na balança Analítica *Mettler AT 201* ($\pm 2 \times 10^{-5}$ g) e semi-analítica *Mettler* ($\pm 2 \times 10^{-3}$ g).

As sínteses dos compostos foram efetuadas em métodos de aquecimento convencional e aquecimento por micro-ondas. No aquecimento convencional foram utilizadas placas de aquecimento da marca *Corning* com termopar incorporado de modelo PC-420D. No caso do aquecimento por micro-ondas foi usado um reator de cavidade monomodo de modelo *CEM Discover* com 300 W de potência máxima de magnetron.

O controlo das reações ao longo das sínteses foi efetuado usando placas de cromatografia em camada fina de sílica gel 60 F₂₅₄ da *Merck*.

Para a purificação dos compostos recorreu-se à cromatografia rápida com sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) da *Merck*. Em alguns casos a separação não foi possível por essa via e em alternativa utilizou-se a técnica de cromatografia em camada fina em placas de vidro revestidas com uma mistura de sílica gel e gesso, secas previamente em estufa à temperatura de 100°C durante 12 h.

Os espetros de RMN foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), registados num aparelho *Bruker Avance III 400*, operando a 400,15 MHz para ^1H e a 100,63 MHz para ^{13}C . Excecionalmente os espetros do ligando **12** foram registados num aparelho *Bruker Avance III HD 600*, operando a 600,13 MHz para ^1H e a 150,92 MHz para ^{13}C . Os desvios químicos (δ) são apresentados em ppm; as constantes de acoplamento (J) em Hz, sendo o padrão interno o TMS. As atribuições do ^1H foram conseguidas com base no espetro bidimensional de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$), enquanto que no caso do ^{13}C essas atribuições foram efetuadas com base nos espetros bidimensionais HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) e HMBC.

Os espetros de massa e de análises elementares foram adquiridos em Santiago de Compostela pelas Unidades de Espetrometria de Massas e Análises Elementares, respetivamente.

Os espetros de absorção eletrónica foram adquiridos com o espectrofotómetro *Perkin Elmer Lambda 25* termoestabilizado à temperatura de 25°C e as medições de fluorescência com o espectrofluorímetro *Varian Cary Eclipse* equipado com um suporte de multicélulas a temperatura constante (25°C) e com uma largura de fenda de 5 nm para a emissão e excitação. Todos os espetros foram adquiridos usando o correspondente comprimento de onda máximo de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}), para cada ligando. Para as medições de pH utilizou-se um medidor de pH da marca Crison - pH meter Basic 20+, equipado com um eletrodo de vidro

(modelo 50 29) e as calibrações foram realizadas a 25°C e usando os tampões de pH 4.01 (Crison, Cod. 94 60) e 7.00 (Crison, Cod. 94 61).

Os dados dos espectros de difração de Raios-X de cristal único foram adquiridos a baixa temperatura num difratómetro marca *Brüker*, modelo X8 Kappa APEX II na Universidade de Aveiro (para o composto **15**) e no difratómetro da linha BM01a do European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble – France (composto **10**).

2.2. Síntese de precursores

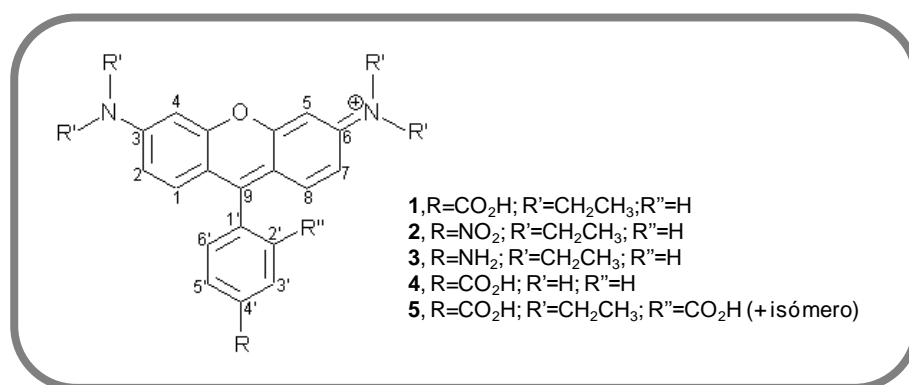


Figura 2.1.1. Estrutura dos derivados de rodamina 1-5.

2.2.1. Síntese da rosamina 1

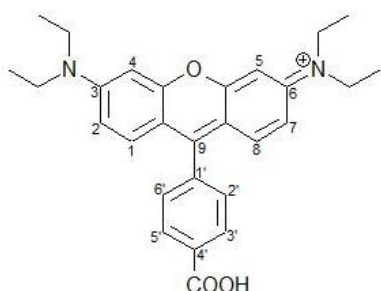
2.2.1.1. Método indireto

Colocou-se num vaso reacional de 10 mL uma solução de 3-dietilaminofenol (0,14 g; 0,86 mmol), 4-formilbenzoato de metilo (0,07 g; 0,43 mmol) e *p*-TsOH (0,01 g; 0,06 mmol) em ácido propiônico (5 mL). De seguida introduziu-se o vaso reacional na cavidade do reator de micro-ondas, nas seguintes condições: 1 min de rampa; 10 min de reação; 100 W de potência máxima; 100 psi e à temperatura de 80°C. Após término da reação e respetivo arrefecimento, adicionou-se uma solução aquosa de acetato de sódio (50 mL) de concentração 3 M. Extraíu-se a fase orgânica com 4 porções de clorofórmio, secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente até à secura. Dissolveu-se o sólido obtido anteriormente em 6 mL de uma mistura clorofórmio/metanol (1:1), à qual se adicionou cloranil (0,11 g; 0,43 mmol). Colocou-se essa mistura num vaso reacional de 10 mL e introduziu-se no micro-ondas nas seguintes condições: 1 min de rampa; 10 min de reação; 50 W de potência máxima; 100 psi e à temperatura de 60°C. Evaporou-se a mistura de solventes à secura. Purificou-se o resíduo resultante numa coluna de cromatografia rápida, usando como eluente uma mistura de

clorofórmio/metanol (8:2). Obtiveram-se 101 mg de rosamina **1.1**, o que corresponde a 51% de rendimento.

Rosamina **1.1**: RMN de ^1H (400,15 MHz; MeOD- d_4) δ /ppm: 1,30-140 (12 H; m; $4\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$); 3,62-3,75 (8 H; m; $4\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$); 4,04 (3 H; s; $-\text{COOCH}_3$); 6,93-7,25 (4 H; m; H-4, 5 e H-2, 7); 7,29 (2 H; d; $J = 9,2$ Hz; H-1, 8); 7,52 (2 H; d; $J = 8,0$ Hz; H-2', 6'); 8,31 (2 H; d; $J = 8,0$ Hz; H-3', 5').

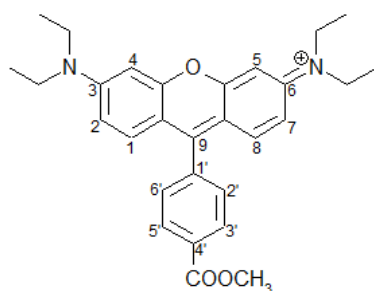
Num vaso reacional de 10 mL colocou-se o composto anteriormente obtido e adicionou-se NaOH (0,08 g; 2,15 mmol) em metanol (5 mL) e água (0,50 mL). Introduziu-se novamente no reator de micro-ondas e ajustou-se nas seguintes condições: 1 min de rampa; 10 min de reação; 100 W; 100 psi e à temperatura de 80°C. Concentrou-se o resíduo obtido e de seguida procedeu-se à extração da fase orgânica com clorofórmio, adicionando primeiramente HCl diluído para a neutralização do NaOH. Concentrou-se novamente o composto obtido e efetuou-se a sua purificação numa coluna de cromatografia rápida, usando como eluente uma mistura de clorofórmio/metanol (8:2). Obtiveram-se 59,9 mg de rosamina **1.1**, o que corresponde a 30% de rendimento.



Rosamina **1**: RMN de ^1H (400,15 MHz; MeOD- d_4) δ /ppm: 1,32 (12 H; t; $J = 7,2$ Hz; $4\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$); 3,70 (8 H; q; $J = 7,2$ Hz; $4\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$); 6,98 (2 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-4, 5); 7,07 (2 H; dd; $J = 9,6$ Hz e $J = 2,4$ Hz; H-2, 7); 7,36 (2 H; d; $J = 9,6$ Hz; H-1, 8); 7,49 (2 H; d; $J = 8,0$ Hz; H-2', 6'); 8,27 (2 H; d; $J = 8,0$ Hz; H-3', 5'). RMN de ^{13}C de acordo com a referência.²⁷

2.2.1.2. Método direto

Usando ácido propiónico como solvente: Colocou-se num vaso reacional de 10 mL uma



solução de 3-dietilaminofenol (0,15 g; 0,86 mmol), ácido 4-formilbenzóico (0,07 g; 0,47 mmol) e *p*-TsOH (0,01 g; 0,06 mmol) em ácido propiónico (5 mL). De seguida fechou-se o vaso reacional e introduziu-se na cavidade do reator de micro-ondas, nas seguintes condições: 1 min de rampa; 10 min de reação; 100 W de potência máxima; 100 psi e à temperatura de 80°C. Após término da reação e respectivo

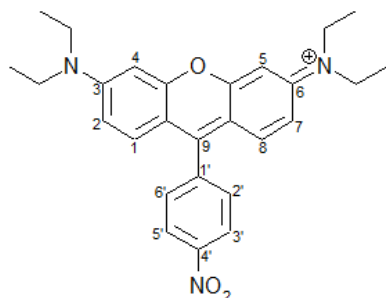
arrefecimento, adicionou-se uma solução aquosa de acetato de sódio 3 M (50 mL). Extraíu-se a fase orgânica resultante com 4 porções de clorofórmio, secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se até à secura. Dissolveu-se o sólido obtido anteriormente em 6 mL de uma mistura clorofórmio/metanol (1:1), à qual se adicionou cloranil (0,11 g; 0,43 mmol). Colocou-se essa mistura num vaso reacional de 10 mL e introduziu-se na cavidade do micro-ondas nas seguintes condições: 1 min de rampa; 10 min de reação; 50 W de potência máxima; 100 psi e à temperatura de 60°C. Procedeu-se posteriormente à purificação do composto obtido, recorrendo a uma coluna de cromatografia rápida, usando como eluente clorofórmio/metanol (8:2). Obtiveram-se 100 mg de rosamina **1**, o que corresponde a 47% de rendimento.

Usando água como solvente: Colocou-se num vaso reacional de 10 mL uma solução de 3-dietilaminofenol (0,15 g; 0,86 mmol), o ácido 4-formilbenzóico (0,07 g; 0,47 mmol) e *p*-TsOH (0,01 g; 0,06 mmol) em água (5 mL). De seguida fechou-se o vaso reacional e introduziu-se na cavidade do reator de micro-ondas, nas seguintes condições: 1 min de rampa; 10 min de reação, 100 W de potência máxima, 100 psi e à temperatura de 80 °C. Após término da reação e respetivo arrefecimento, decantou-se a fase aquosa resultante e colocou-se o vaso reacional com o resíduo obtido a secar na estufa. Dissolveu-se o sólido em 6 mL de uma mistura clorofórmio/metanol (1:1), à qual se adicionou cloranil (0,11 g; 0,43 mmol). Introduziu-se essa solução na cavidade do micro-ondas nas seguintes condições: 1 min de rampa; 10 min de reação; 50 W de potência máxima; 100 psi e à temperatura de 60 °C. Procedeu-se de seguida à purificação do composto obtido, recorrendo a uma coluna de cromatografia rápida, usando como eluente clorofórmio/metanol (8:2). Obtiveram-se 100 mg de rosamina **1**, o que corresponde a 47% de rendimento.

2.2.3. Síntese da rosamina 2

Colocou-se num balão de fundo redondo de 100 mL, uma solução de 3-dietilaminofenol (0,43 g; 2,58 mmol), 4-nitrobenzaldeído (0,19 g; 1,32 mmol) e *p*-TsOH (0,03 g; 0,02 mmol) em 15 mL de água. De seguida introduziu-se o balão com condensador na cavidade do reator de micro-ondas, em modo de sistema aberto, nas seguintes condições: 100 W, 1 min de rampa, 10 min de reação e à temperatura de 100°C. Após terminar a reação, decantou-se a fase aquosa e colocou-se o resíduo obtido na estufa a secar. Dissolveu-se o resíduo seco em 18 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (1:1), à qual se adicionou cloranil (0,48 g; 1,80 mmol). Colocou-se na cavidade do reator de micro-ondas em modo de sistema aberto, nas seguintes condições: 50 W de potência máxima, 1 min de rampa, 10 min de reação à temperatura de 60°C. Purificou-se o composto obtido por coluna de cromatografia rápida, usando como eluente

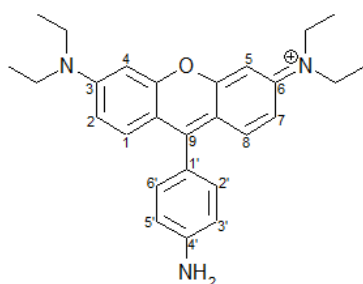
uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1). Obtiveram-se 463 mg de rosamina **2**, o que corresponde a 79% de rendimento.



Rosamina **2**: RMN de ^1H (400,15 MHz; CDCl_3) δ /ppm: 1,37 (12 H; t; $J = 7,2$; $4\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$); 3,75 (8 H; q; $J = 7,2$ Hz; $4\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$); 6,80 (2 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-4, 5); 6,99 (2 H; dd; $J = 9,2$ Hz e $J = 2,4$ Hz; H-2, 7); 7,22 (2 H; d; $J = 9,2$ Hz; H-1, 8); 7,68 (2 H; d; $J = 8,8$ Hz; H-2', 6'); 8,52 (2 H; d; $J = 8,8$ Hz; H-3', 5'). RMN de ^{13}C de acordo com a referência.²⁷

2.2.4. Síntese da rosamina 3

Redução com estanho: Dissolveu-se a rosamina **2** (193,5 mg; 0,44 mmol) em clorofórmio (24 mL) num balão de fundo redondo de 100 mL. De seguida adicionou-se estanho em pó (3,38 g) e ácido clorídrico (12 mL). Fechou-se o balão com uma rolha de plástico e colocou-se sob agitação à temperatura ambiente durante 2h30min. Após terminar o tempo de reação procedeu-se à sua neutralização, para isso preparou-se uma solução saturada de bicarbonato de sódio e adicionou-se lentamente à mistura obtida, até atingir o pH (≈ 9). Extraíu-se o composto usando uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1), secou-se posteriormente com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. Purificou-se o composto obtido recorrendo a uma coluna de cromatografia rápida, usando como eluente clorofórmio/metanol (9:1). Obtendo-se 34,5 mg o que corresponde a 19% de rendimento.

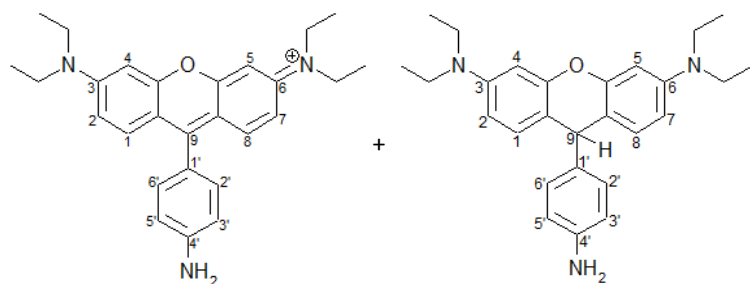


Rosamina **3**: RMN de ^1H (400,15 MHz; CDCl_3) δ /ppm: 1,26 (12 H; t; $J = 7,2$ Hz; $4\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$); 3,56 (8 H; q; $J = 7,2$ Hz; $4\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$); 6,73 (2 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-4, 5); 6,80 (2 H; dd; $J = 9,6$ Hz; $J = 2,4$ Hz; H-2, 7); 6,94 (2 H; d; $J = 9,6$ Hz; H-1, 8); 7,08 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-2', 6'); 7,60 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-3', 5'). RMN de ^{13}C de acordo com a referência.²⁷

Hidrogenólise com ciclohexeno em Pd/C: Preparou-se uma solução de Ros **2** (0,03 g; 0,07 mmol), ciclohexeno (21 μL ; 0,21 mmol) em etanol (0,50 mL) e adicionou-se uma microespátula de Pd/C (10 %). Introduziu-se o vaso reacional na cavidade do micro-ondas nas seguintes condições: 100 psi, 100 W, 1 min de rampa, 20 min de reação a temperatura de 130°C. Após terminar a reação e seu arrefecimento, filtrou-se o Pd/C e evaporou-se o solvente à secura. O resíduo obtido foi posteriormente purificado por coluna de cromatografia rápida, usando como

eluente uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1). Obtendo-se 19,0 mg o que corresponde a 66% de rendimento.

Hidrogenólise com H_2 em Pd/C: Preparou-se uma solução de rosamina **2** (0,02 mg; 0,05 mmol), em etanol (0,5 mL) e adicionou-se uma quantidade catalítica de Pd/C (10%). Posteriormente a mistura foi colocada sob atmosfera de hidrogénio à pressão de 5 bar e a temperatura constante, durante 18 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com etanol e o solvente evaporado com a ajuda do evaporador rotativo. O resíduo resultante foi analisado por RMN de 1H . Segundo a análise do espectro de RMN o resíduo obtido contém 35% de rosamina **3** e 65% de di-hidrorosamina **3.1**.

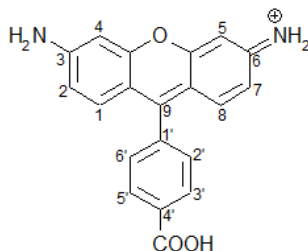


Mistura obtida de rosamina **3** e di-hidrorosamina **3.1**: RMN de 1H (400,15 MHz; $CDCl_3$) δ /ppm: 1,26 e 1,37 (2 t; $J = 7,2$ Hz; CH_2CH_3); 3,40 (s largo, CH_2CH_3); 3,64 (q; $J = 7,2$ Hz; CH_2CH_3); 5,02 (s; H-9); 6,63 (d; $J = 8,4$ Hz; H-Ar); 6,74-6,76 (m; H-Ar); 6,89-7,05 (m, H-Ar); 7,19 (d; $J = 8,4$ Hz; H-Ar); 7,64 (d; $J = 9,6$ Hz; H-Ar).

Ar); 7,19 (d; $J = 8,4$ Hz; H-Ar); 7,64 (d; $J = 9,6$ Hz; H-Ar).

2.2.5. Síntese de rosamina 4

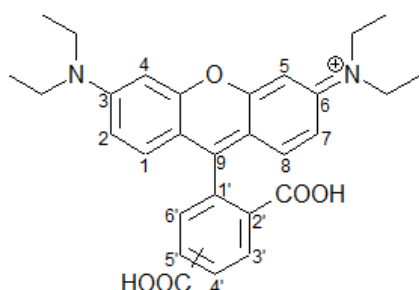
Dissolveu-se 3-aminofenol (1,00 g; 9,17 mmol) e ácido 4-formilbenzóico (0,69 g; 4,60 mmol) em clorofórmio (20 mL). Removeu-se o solvente com a ajuda do evaporador rotativo e suspendeu-se a mistura em H_2SO_4 frio a 60% (20 mL). Colocou-se em aquecimento à temperatura de $150^\circ C$ e em agitação durante 24h. Após esse período deixou-se arrefecer a mistura até à temperatura ambiente, adicionando-se cloranil (1,68 g; 6,83 mmol) e agitando-se à temperatura ambiente durante 10 min. Adicionou-se um pouco de metanol e carbonato de potássio anidro. Filtrou-se e evaporou-se à securo. Efetuaram-se duas purificações, em coluna de cromatografia, usando como eluente clorofórmio/metanol (7:3). Obtendo-se 2,2 mg que corresponde a 1,3 % de rendimento.



Rosamina **4**: RMN de 1H (400,15 MHz; $MeOD-d_4$) δ /ppm: 6,82 (2 H; d; $J = 2,0$ Hz; H-4, 5); 6,86 (2 H; dd; $J = 2,0$ Hz e $J = 9,2$ Hz; H-2, 7); 7,32 (2 H; d; $J = 9,2$ Hz; H-1, 8); 7,45 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-2', 6'); 8,18 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-3', 5'). EA (ESI) $m/z = 331$ (M^+).

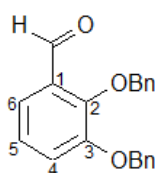
2.2.6. Síntese de rodamina 5

A uma solução de anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico (1,64 g; 8,51 mmol), 3-dietilaminofenol (3,01 g; 18,2 mmol) em ácido metanossulfónico (25 mL), colocou-se sob aquecimento a 165°C e agitação durante 3,5 h. Após o término da reação deixou-se arrefecer a mistura à temperatura ambiente. Verteu-se a mistura num recipiente com água e gelo e de seguida procedeu-se à extração da fase orgânica usando como solvente diclorometano/metanol (9:1). Evaporou-se a fase orgânica até à secura. A purificação do composto foi efetuada recorrendo à cromatografia rápida usando como eluente diclorometano/metanol (9:1). Obtendo-se 232 mg o que corresponde a 5,6% de rendimento.



Rodamina **5** (mistura dos isómeros 4' e 5'): RMN de ^1H (400,15 MHz; MeOD- d_4) δ /ppm: 1,14 (12 H; t; $J = 7,2$ Hz; 4x-CH $_2$ CH $_3$); 3,44 (8 H; q; $J = 7,2$ Hz; 4x-CH $_2$ CH $_3$); 7,70 e 7,77 (2 H; 2 d; $J = 8,0$ Hz; H-Ar); 8,12-8,19 (4 H; m; H-Ar); 8,31 (2 H; d; $J = 1,6$ Hz; H-Ar); 8,40 e 8,63 (1 H; d; $J = 1,8$ Hz; H-Ar).

2.2.7. Síntese de 2,3-dibenziloxibenzaldeído **6**

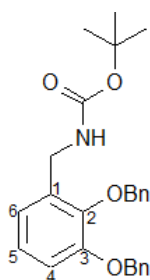


Preparou-se uma solução de 2,3-dihidroxibenzaldeído (7,24 mmol; 1,00 g) e carbonato de potássio (15,90 mmol; 2,20 g) em DMF (20 mL) à temperatura de 0°C. Adicionou-se gota a gota e sob atmosfera de argon brometo de benzilo (15,90 mmol; 1,89 mL). Colocou-se a mistura em agitação à temperatura de 0°C durante 15 min, deixando-se de seguida à temperatura ambiente durante 4 h. Após esse período de tempo a mistura reacional foi precipitada numa mistura de água e gelo e neutralizada usando ácido cítrico. O sólido branco formado foi filtrado e lavado várias vezes com água. O composto formado **6** foi dissolvido em clorofórmio e cristalizado com hexano.

6: RMN de ^1H (400,15 MHz; CDCl $_3$) δ /ppm: 5,10 e 5,21 (4 H; 2s; 2x-CH $_2$); 6,91 (1 H; dt; $J = 8,1$ Hz e $J = 0,7$ Hz; H-Ar); 7,33-7,38, 7,45-7,39 e 7,51-7,48 (12 H; 3 m; H-Ar); 10,28 (1H; s; -CHO). RMN de ^{13}C de acordo com a referência.²⁸

2.2.8. Síntese de *tert*-butil-2,3-dibenziloxibenzilcarbamato 7

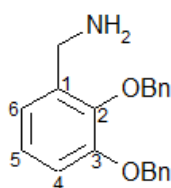
Preparou-se uma solução de **6** (1,00 g; 3,14 mmol), *t*-butilcarbamato (1,10 g; 9,43 mmol), trietilsilano (1,50 mL; 9,43 mmol), ácido trifluoroacético (0,47 mL; 6,30 mmol) em acetonitrilo (40 mL) e colocou-se em agitação à temperatura ambiente durante 5 h. Após esse período de tempo a mistura reacional foi precipitada numa solução aquosa saturada de NaHCO₃ e água gelada. O sólido branco formado foi filtrado, lavado com água e seco por vácuo.



7: RMN de ¹H (400,15 MHz; CDCl₃) δ/ppm: 1,48 (9 H; 1s; -CH₃); 4,16 (2 H; d; *J*= 6,0 Hz; CH₂NH); 5,00-5,07 (4 H; 2s; 2x-CH₂C₆H₅); 6,85-6,96 (3 H; m; H-Ar); 7,35-7,26 (10 H; m; 2x -CH₂C₆H₅). RMN de ¹³C de acordo com a referência.²⁸

2.2.9. Síntese de 2,3-dibenziloxibenzilamina 8

Preparou-se uma solução de *tert*-butil-2,3-dibenziloxibenzilcarbamato (1,26 g; 3,01 mmol) em ácido trifluoroacético (2 mL) e colocou-se em agitação à temperatura ambiente durante 15 min. Após esse período de tempo neutralizou-se a mistura reacional usando uma solução aquosa saturada de NaHCO₃. O sólido formado foi filtrado e lavado com água, seco e purificado recorrendo à cromatografia rápida – usando primeiro clorofórmio como eluente (para remover uma pequena quantidade de material de partida), passando-se de seguida para o eluente clorofórmio/metanol (9:1). Cristalizou-se o composto obtido **8** em hexano, obtendo-se 368 mg o que corresponde a 38% de rendimento.

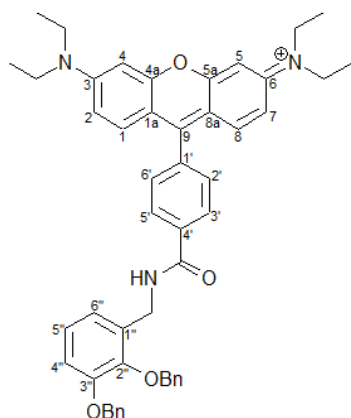


8: RMN de ¹H (400,15 MHz; CDCl₃) δ/ppm: 3,79 (2 H; s; -CH₂NH₂); 5,11 e 5,16 (2 H; 2 s; 2x -CH₂C₆H₅); 6,92 (1 H; dd; *J*= 6,0 Hz e *J*= 1,6 Hz; H-6); 6,95 (1 H; dd; *J*= 6,0 Hz e *J*= 1,6 Hz; H-4); 7,02 (1 H; t; *J*= 8,0 Hz; H-5); 7,35-7,33 (10 H; m; 2x-CH₂C₆H₅). RMN de ¹³C de acordo com a referência.²⁸

2.3. Síntese de conjugados rodamina-catecol

2.3.1. Síntese de 9

Síntese (A): Colocou-se num vaso reacional uma solução de rosamina **1** (20,7 mg; 0,05 mmol), 2,3-dibenziloxibenzilamina (28,7 mg; 0,09 mmol), EDC (8,1 mg; 0,05 mmol), DIPEA (0,02 mL; 0,11 mmol), HOBt (7,1 mg; 0,05 mmol) em DMF (0,3 mL). Introduziu-se o vaso reacional na cavidade do reator de micro-ondas, em modo de vaso fechado, nas seguintes condições: 100 W de potência máxima, 200 psi de pressão, 1 min de rampa, 20 min de tempo de reação à temperatura de 75°C. Após terminar a reação procedeu-se à extração do produto com clorofórmio. Secou-se a fase orgânica recolhida com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. O composto obtido foi purificado por cromatografia rápida utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1) como eluente. Obtendo-se 26,9 mg do conjugado **9** o que corresponde a 77% de rendimento.

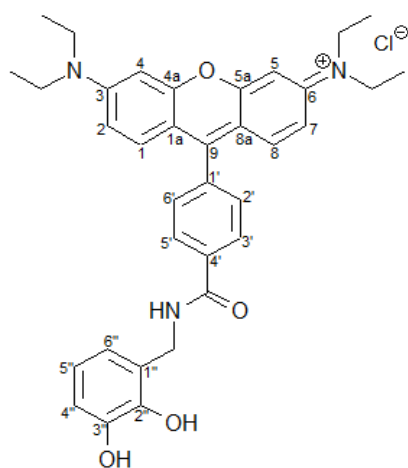


9: RMN de ^1H (400,15 MHz; CDCl_3) δ /ppm: 1,33 (12 H; t; $J=7,2$ Hz; $4\times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,63 (8 H; q; $J=7,2$ Hz; $4\times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,73 (2 H; d; $J=6,0$ Hz; $-\text{NHCH}_2$); 5,13 (2 H; s; $3''-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 5,18 (2 H; s; $2''-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 6,81 (2 H; d; $J=2,3$ Hz; H-4, 5); 6,89 (2 H; dd; $J=9,6$ Hz e $J=2,3$ Hz; H-2, 7); 6,92 (1 H; dd; $J=8,0$ Hz e $J=1,2$ Hz; H-4''); 7,01 (1 H; dd; $J=8,0$ Hz e $J=7,6$ Hz; H-5''); 7,15 (1 H; d; $J=7,6$ Hz; H-6''); 7,30-7,40 e 7,46-7,48 (14 H, 2 m, H-Ar), 8,20 (2 H; d; $J=8,0$ Hz; H-3', 5'); 8,40 (1 H; t; $J=6,0$ Hz; $-\text{NHCH}_2$).
RMN de ^{13}C (100,62 MHz; CDCl_3) δ /ppm: 12,8 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 39,5 (HNCH_2); 46,3 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 75,0 e 71,2 ($2\times -\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 96,6 (C-4, 5); 113,3 (C-4''); 114,4 (C-2, 7); 122,0 (C-6''), 124,5 (C-5''), 127,7, 128,1 (C-3', 5'); 128,5, 128,6, 128,7; 128,8; 129,6; 132,3; 138,0; 142,5 (C-2''); 151,9 (C-3''); 155,7; 158,1; 166,0 ($-\text{HNC}=\text{O}$). EM (ESI) m/z 744 M^+ .

Síntese (B): Colocou-se num vaso reacional uma solução de rosamina **1** (20,7 mg; 0,05 mmol); 2,3-dibenziloxibenzilamina (29,1 mg; 0,09 mmol); COMU (22,1 mg; 0,05 mmol); DIPEA (0,02 mL; 0,10 mmol) em DMF (0,3 mL). Introduziu-se o vaso reacional na cavidade do reator de micro-ondas em modo de vaso fechado nas seguintes condições: 100 W de potência máxima, 200 psi de pressão, 1 min de rampa, 10 min de tempo de reação à temperatura de 75°C. Após terminar a reação procedeu-se à extração do produto pretendido. Primeiramente adicionou-se água destilada para dissolver possíveis produtos secundários resultantes do acoplamento, extraíndo-se de seguida com clorofórmio. Secou-se a fase orgânica recolhida com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. O composto obtido foi purificado por cromatografia rápida utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1) como eluente. Obtendo-se 6,9 mg do conjugado **9** o que corresponde a 20% de rendimento.

2.3.2. Síntese de 10

Num balão de três tubuladuras, arrefecido num banho de gelo, dissolveu-se o composto **9** (101,5 mg; 0,14 mmol) em diclorometano (8 mL). Adicionou-se gota a gota BCl_3 (2 mL) e deixou-se a mistura em atmosfera de árgon e sob agitação num banho de gelo durante 18 h. Após esse período de tempo adicionou-se metanol (18 mL) à mistura e deixou-se durante 30 min sob agitação à temperatura ambiente. De seguida procedeu-se a lavagens com acetona e metanol (15 mL) evaporando-se o solvente a pressão reduzida. Cristalizou-se o sólido obtido com clorofórmio e hexano. Obtendo-se 56,7 mg do conjugado **10** o que corresponde a 68% de rendimento.



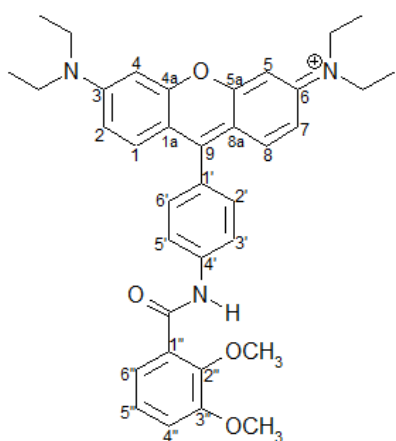
10: RMN de ^1H (MeOD-d_4 ; 400,15 MHz), δ/ppm : 1,31 (12 H; t; $J = 7,2$ Hz; $4 \times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,69 (8 H; q; $J = 7,2$ Hz; $4 \times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,60 (2 H; s; $-\text{NHCH}_2$); 6,67 (1 H; dd; $J = 8,0$ Hz e $J = 7,6$ Hz; H-5''); 6,75 (1 H; dd; $J = 8,0$ Hz e $J = 1,6$ Hz; H-4''); 6,78 (1 H; dd; $J = 7,6$ Hz e $J = 1,6$ Hz; H-6''); 6,98 (2 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-4, 5); 7,07 (2 H; dd; $J = 9,4$ Hz e $J = 2,4$ Hz; H-2, 7); 7,32 (2 H; d; $J = 9,4$ Hz; H-1, 8); 7,57 (2 H; d; $J = 8,0$ Hz; H-2', 6'); 8,13 (2 H; d; $J = 8,0$ Hz; H-3', 5'). RMN de ^{13}C (100,62 MHz; MeOD-d_4) δ/ppm : 11,8 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 39,6 ($-\text{HNCH}_2$); 45,9 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 96,5 (C-4, 5); 113,3 (C1a, 8a); 114,6 (C-2, 7); 114,7 (C-4''); 119,7 (C-5''); 120,5 (C-6''); 125,3 (C-1'); 128,0 (C-3', 5'); 130,0 (C-2', 6'); 131,8 (C-1, 8); 135,8 (C-1'); 135,9 (C-4'); 143,7 (C-2''); 145,8 (C-3''); 156,2 (C-3, 6); 156,6 (C-9); 158,5 (C-4a, 5a); 168,5 ($-\text{CONH}$).

RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 400,15 MHz), δ/ppm : 1,22 (12 H; t; $J = 7,0$ Hz; $4 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,67 (8 H; q; $J = 7,0$ Hz; $4 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,50 (2 H; s; $-\text{NHCH}_2$); 6,62 (1 H; t; $J = 7,6$ Hz; H-5''); 6,68 (1 H; d; $J = 7,6$ Hz; H-4''); 6,72 (1 H; dd; $J = 7,6$ e $J = 2,0$ Hz; H-6''); 7,00 (2 H; d; $J = 2,3$ Hz; H-4, 5); 7,14 (2 H; dd; $J = 9,6$ e $J = 2,3$ Hz; H-2, 7); 7,24 (2 H; d; $J = 9,6$ Hz; H-1, 8); 7,64 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-2', 6'); 8,20 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-3', 5'); 8,72 (1 H; s; $-\text{NH}$); 9,19-9,21 (2 H; m; $-\text{OH}$). RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 , 100,62 MHz) δ/ppm : 12,5 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); $-\text{NHCH}_2$ debaixo do sinal do DMSO, 45,4 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 96,1 (C-4, 5); 112,6 (C1a, 8a); 114,3 (C-2, 7); 114,6 (C-4''); 118,7 (C-5''); 125,9 (C-1'); 127,7 (C-3', 5'); 129,6 (C-2', 6'); 131,5 (C-1, 8); 134,6 (C-1'); 135,5 (C-4'); 142,9 (C-2''); 145,2 (C-3''); 155,2 (C-3, 6); 155,7 (C-9); 157,4 (C-4a, 5a); 165,8 ($-\text{CONH}$). HRMS (ESI-TOF): calculado $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 564,2857; encontrado 564,2847. AE para $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{ClN}_3\text{O}_4$. CHCl_3 encontrado (%): C 60,09; H 5,46; N, 5,84; calculado C 60,22; H, 5,63; N 5,88.

2.3.3. Síntese de 11

Colocou-se num vaso reacional uma solução contendo rosamina **3** (0,05 g; 0,12 mmol), ácido-2,3-dimetoxibenzoico (0,04 g; 0,24 mmol), EDC (0,04 g; 0,25 mmol), HOBt (0,04 g; 0,25 mmol) e DIPEA (0,04 mL; 0,24 mmol) em DMF (0,80 mL). Introduziu-se o vaso reacional na cavidade do micro-ondas, em modo de vaso fechado, nas seguintes condições: 100 W de potência máxima, 200 psi de pressão, 1 min de rampa, 20 min de tempo de reação à temperatura de 75°C.

Purificou-se o composto obtido por cromatografia rápida, usando como eluente clorofórmio/metanol (9:1). Obtendo-se 32,6 mg do conjugado **11**, correspondendo a 45% de rendimento.



11: RMN de ^1H (400,15 MHz; CDCl_3) δ /ppm: 1,36 (12 H; t; $J = 7,2$ Hz; $4\times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,69 (8 H; q; $J = 7,2$ Hz; $4\times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,97 e 4,10 (6 H; 2s; $2\times -\text{OCH}_3$); 6,86 (2 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-4, 5); 6,98 (2 H; dd; $J = 9,6$ Hz e $J = 2,4$ Hz; H-2, 7); 7,16 (1 H; dd; $J = 8,4$ Hz e $J = 1,6$ Hz; H-4''); 7,26 (1 H; dd; $J = 8,4$ Hz e $J = 7,8$ Hz; H-5''); 7,43 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-3', 5'); 7,49 (2 H; d; $J = 9,6$ Hz; H-1, 8); 7,82 (1 H; dd; $J = 8,0$ Hz e $J = 1,6$ Hz; H-6''); 8,17 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-2', 6'); 10,45 (1 H; s; $-\text{NH}$). RMN de ^{13}C (100,62 MHz; CDCl_3) δ /ppm: 13,6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 47,1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 57,1 (C-3''- OCH_3); 62,8 (C-2''- OCH_3); 97,5 (C-4, 5); 114,2 (C-1a, 8a); 115,1 (C-2, 7); 117,1 (C-4''); 121,3 (C-3', 5'); 123,8 (C-6''); 125,8 (C-5''); 127,3 (C-1'); 127,9 (C-1''); 131,6 (C-2', 6'); 133,1 (C-1, 8); 141,6 (C-4'); 148,3 (C-2''); 153,6 (C-3''); 156,4 (C-3, 6); 158,1 (C-9); 158,9 (C-4a, 5a); 164,6 ($-\text{CONH}$).

2.3.4. Síntese de 12

Num balão de três tubuladuras, arrefecido num banho de gelo, dissolveu-se o conjugado **11** (68,9 mg; 0,12 mmol) em diclorometano (10 mL). Adicionou-se gota a gota BCl_3 (2 mL) e deixou-se a mistura em atmosfera de árgon e agitação num banho de gelo durante 18 h. Após esse período de tempo adicionou-se metanol (18 mL) à mistura reacional e deixou-se durante 30 min sob agitação à temperatura ambiente. De seguida procedeu-se a lavagens com acetona e metanol (15 mL) evaporando-se o solvente a pressão reduzida. Cristalizou-se o sólido obtido com clorofórmio e hexano. Analisando por RMN verificou-se a remoção de só um dos grupos $-\text{OCH}_3$, levando à repetição do procedimento anteriormente citado, usando-se porém desta vez

diclorometano (5 mL) e BCl_3 (1 mL). Obtendo-se 16,0 mg do conjugado **12** o que corresponde a um rendimento de 23%.

12: RMN de ^1H (MeOD-d_4 ; 400,15 MHz) δ /ppm: 1,23 (12 H; t; $J = 7,0$ Hz; $4 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,61 (8 H; q; $J = 7,0$ Hz; $4 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$); 6,75 (1 H; t; $J = 8,0$ Hz; H-5''); 6,89 (2 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-4, 5); 6,94 (1 H; dd; $J = 8,0$ e $J = 1,3$ Hz; H-4''); 7,02 (2 H; dd; $J = 9,6$ e $J = 2,4$ Hz; H-2, 7); 7,40-7,47 (5 H; m; H-1,8 e H-3', 5' e H-6''); 7,95 (2 H; d; $J = 8,4$ Hz; H-2', 6').

RMN de ^1H (DMSO-d_6 ; 600,13 MHz) δ /ppm: 1,22-1,28 (12 H; m; $4 \times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,66-3,71 (8 H; m; $4 \times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 6,83 (1 H; t; $J = 5,3$ Hz; H-5''); 6,99 (2 H; d; $J = 1,6$ Hz; H-4, 5); 7,04 (1 H; d; $J = 5,3$ Hz; H-4''); 7,17-7,19 (2 H; m; H-2, 7); 7,38-7,41 (2 H; m; H-1, 8); 7,45-7,48 (1 H; m; H-6''); 7,55-7,58 (2 H; m; H-3', 5'); 8,05-8,08 (2 H; m; H-2', 6'); 9,60 (1 H; s; -OH); 10,70-10,68 (1 H; d; $J = 6,4$ Hz; -NH); 11,25-11,21 (1 H; m; -OH). RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 ; 150 MHz) δ /ppm: 13,8 (CH_2CH_3); 45,8 (CH_2CH_3); 96,5 (C-4, 5); 113,1; 115,0 (C-2, 7); 115,1; 115,2; 117,1; 118,6 (C-5''); 119,2 (C-4''); 119,5; 121,1 (C-2', 6'); 127,1; 127,5; 130,9 (C-3', 5'); 131,1; 132,2 (C-1, 8); 132,8; 140,9; 146,7; 148,0; 148,1; 154,7; 155,5; 156,8; 157,9; 158,5; 168,1 (-CONH).

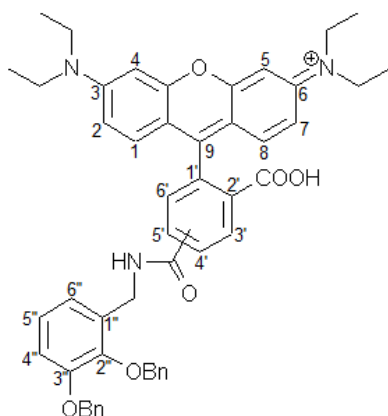
HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ = 550,2700; encontrado 550,2703.

2.3.5. Síntese de 13

Aquecimento por micro-ondas: Colocou-se num vaso reacional uma solução de rodamina **5** (0,06 g; 0,12 mmol), 2,3-dibenziloxibenzilamina (0,08 g; 0,25 mmol), EDC (0,02 g; 0,13 mmol), HOBt (0,02 g; 0,13 mmol), DIPEA (0,04 mL; 0,24 mmol) em DMF (0,8 mL). Introduziu-se o vaso reacional na cavidade do reator de micro-ondas, em modo de vaso fechado, nas seguintes condições: 100 W de potência máxima, 200 psi de pressão, 1 min de rampa, 20 min de tempo de reação à temperatura de 75°C. A mistura obtida foi purificada por cromatografia rápida utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1) como eluente, tendo-se isolado uma fração (aproximadamente 5,2 mg) que foi posteriormente analisada por RMN de ^1H . O espectro obtido

sugeriu a presença de uma mistura de **13** e 2,3-dibenziloxibenzilamina de partida que ficou por reagir.

Mistura obtida de **13** e 2,3-dibenziloxibenzilamina. RMN de ^1H (400,15 MHz; MeOD-d_4) δ /ppm: 1,32 (12 H; t; $J = 7,2$ Hz; $4 \times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,69 (8 H; q; $J = 7,2$ Hz; $4 \times -\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,12 e 5,15 (2 H; s; $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 6,78 (1 H; dd; $J = 9,2$ Hz e $J = 7,6$ Hz; H-Ar); 6,86 (1 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-Ar); 6,97 (2 H; dd; $J = 8,0$ Hz e $J = 1,2$ Hz; H-4''); 6,99 (1 H; dd; $J = 8,0$ Hz; H-5''); 7,06 (1 H; d; $J = 7,6$ Hz; H-6''); 7,28-7,49 (10 H; m; $2 \times -\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 7,90 (2 H; dd; $J = 7,6$ Hz e $J = 7,2$ Hz; H-Ar); 8,07 (1 H; dd; $J = 9,6$ Hz e $J = 9,2$

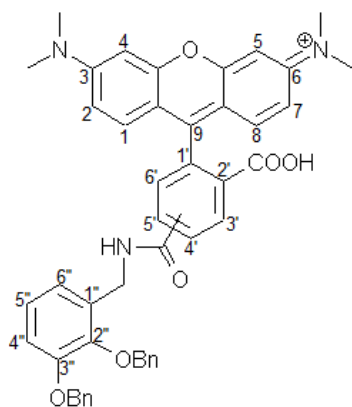


Hz; H-Ar); 8,39 (1 H; dd; $J = 6,0$ e $J = 1,6$ Hz; H-Ar); 8,41 (1 H; d; $J = 1,2$ Hz; H-Ar).

2.3.6. Síntese de 14

Aquecimento por micro-ondas: Colocou-se num vaso reacional uma solução de 5(6)-carboxitetrametilrodamina (0,01 g; 0,03 mmol), 2,3-dibenziloxibenzilamina (0,02 g; 0,06 mmol), EDC (0,005 g; 0,03 mmol), HOBt (0,005 g; 0,03 mmol), DIPEA (0,10 mL; 0,06 mmol) em DMF (0,80 mL). Introduziu-se o vaso reacional na cavidade do reator de micro-ondas, em modo de vaso fechado, nas seguintes condições: 100 W de potência máxima, 200 psi de pressão, 1 min de rampa, 20 min de tempo de reação à temperatura de 75°C. A mistura obtida foi purificada por TLC preparativa utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1) como eluente. Recolheram-se duas frações. A primeira fração correspondia ao isómero 4' da rodamina **14**, enquanto a segunda fração correspondia ao isómero 5' da rodamina **14**.

Obtendo-se 2,6 mg de isómero 4' o que corresponde a 12% de rendimento e 2,3 mg de isómero 5' o que corresponde a 11% de rendimento.

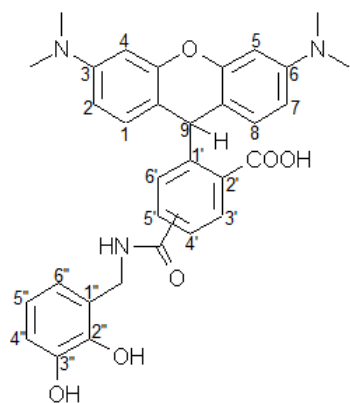


14: RMN ^1H (isómero-4', MeOD- d_4 ; 600,13 MHz) δ /ppm: 3,26 (12 H; s; rod-CH₃); 4,64 (2 H; s; CH₂NH); 5,12 e 5,17 (4 H; 2 s; 2x-CH₂C₆H₅); 6,90 (2 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-4, 5); 7,00 (2 H; dd; $J = 9,4$ e $J = 2,4$ Hz; H-2, 7); 7,01-7,09 (3 H; m; H-4'', 5'', H-6''); 7,23 (2 H; d; $J = 9,4$ Hz; H-1, 8); 7,29-7,52 (13 H; m; 2x-CH₂C₆H₅ e H-6'); 8,03 (1 H; dd; $J = 8,0$ e $J = 1,6$ Hz; H-5'), 8,53 (1 H; s; H-3'). RMN de ^{13}C (MeOD- d_4 ; 150,92 MHz) δ /ppm: 39,9 (CH₂NH); 40,8 (rod-CH₃); 72,0 e 75,9 (2x-CH₂C₆H₅); 97,3 (C-4, 5); 114,7; 114,8; 115,0; 121,9; 125,4; 128,9; 129,1; 129,1; 129,4; 129,6; 129,7; 129,8; 130,9; 132,6; 133,8; 137,0; 137,1; 138,6; 139,1; 147,3; 153,3; 158,7; 159,0; 161,9; 169,0; 172,1.

RMN de ^1H (isómero-5'; MeOD- d_4 ; 600,13 MHz) δ /ppm: 3,31 (12 H; s; rod-CH₃); 4,59 (2 H; s; CH₂NH); 5,07 e 5,16 (4 H; 2 s; 2x-CH₂C₆H₅); 6,95 (1 H; dd; $J = 7,4$ e $J = 1,7$ Hz; cat-H); 6,99 (2 H; d; $J = 2,4$ Hz; H-4, 5); 7,04 (2 H; dd; $J = 9,5$ e $J = 2,4$ Hz; H-2, 7); 7,07-7,11 (2 H; m; cat-H); 7,15 (2 H; d; $J = 9,5$ Hz; H-1, 8); 7,22-7,24; 7,32-7,40 e 7,48-7,50 (10 H; 3 m; 2x-CH₂C₆H₅); 7,74 (1 H; d; $J = 1,6$ Hz; H-6'); 8,16 (1 H; dd; $J = 8,2$ e $J = 1,6$ Hz; H-4'); 8,37 (1 H; d; $J = 8,2$ Hz; H-3'). RMN de ^{13}C (MeOD- d_4 ; 150,92 MHz) δ /ppm: 39,5 (-CH₂NH); 42,4 (rod-CH₃); 70,6 e 74,4 (2x-CH₂C₆H₅); 96,0 (C-4,5); 113,5; 113,6; 114,1 (C-2, 7); 120,9; 124,0; 127,5; 127,6; 127,7; 127,9; 128,15; 128,24; 128,6; 130,7; 131,2; 133,9; 137,1; 137,6; 146,0; 151,9; 157,6; 157,7; 166,5; 168,0.

2.3.7. Síntese de 15

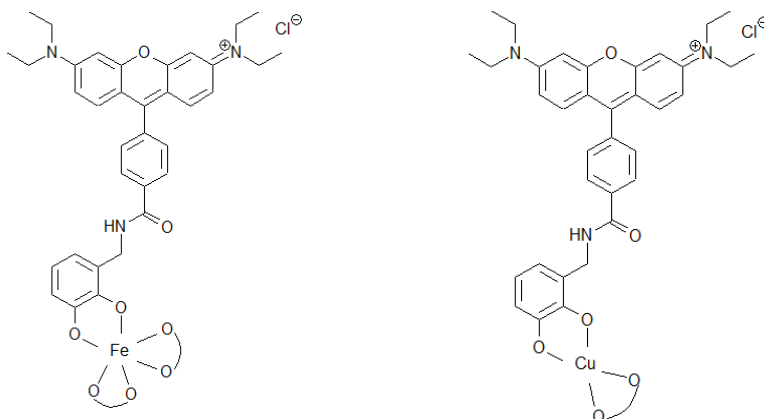
Num vaso de hidrogenação preparou-se uma solução do isómero 4' (ou isómero 5') (2,3 mg; 3,07 mmol) em metanol (5 mL) e HCl (0,01 mL). Adicionou-se uma quantidade catalítica de 10% Pd/C sob atmosfera de árgon. Colocou-se a mistura no hidrogenador à temperatura ambiente, sob agitação, na presença de H₂ à pressão de 5 bar durante 5 h. Após término da reação procedeu-se à filtração da mistura e evaporação do solvente sob pressão reduzida. Cristalizou-se o produto obtido usando uma mistura de metanol/clorofórmio. Uma vez que estas sínteses foram realizadas com quantidades muito pequenas de rodaminas, não foi possível calcular os valores de rendimentos das reações.



15: RMN de ¹H (isómero-4'; MeOD-d₄; 400,15 MHz) δ/ppm: 3,20 (12 H; s; rod-CH₃); 4,42 (2 H; s; -CH₂NH); 6,52-6,63 (4 H; m; H-9 e cat-H); 7,02-7,20 (6 H; m; xanteno-H); 7,36-7,37 (1 H; m; Ar-H); 7,75 (1 H; dd; *J* = 8,0 e *J* = 2,0 Hz; Ar-H), 8,37 (1 H; d; *J* = 2,0 Hz; Ar-H).

RMN de ¹H (isómero-5', MeOD-d₄; 400,15 MHz) δ/ ppm: 3,18 (12 H; s; rod-CH₃); 4,33 (2 H; s; CH₂NH); 6,48 (1 H; s; 9-H); 6,50-6,54 (2 H; m; cat-H); 6,60 (1 H; dd; *J* = 7,2 e *J* = 2,2 Hz; cat-H); 7,07 (2 H; dd; *J* = 8,6 e *J* = 2,1 Hz; H-2, 7); 7,14 (2 H; d; *J* = 8,6 Hz; H-1, 8); 7,32 (2 H; d; *J* = 2,1 Hz; H-4, 5); 7,47 (1 H; d; *J* = 1,6 Hz; H-6'); 7,64 (1 H; dd; *J* = 8,2 e *J* = 1,6 Hz; H-4'); 7,94 (1 H; d; *J* = 8,2 Hz; H-3'). RMN de ¹³C (MeOD-d₄; 150,92 MHz) δ/ppm: 38,0 (C-9); 39,1 (-CH₂NH); 42,4 (rod-CH₃); 107,5 (C-4, 5); 114,3; 114,7; 119,2; 120,0; 124,7; 125,1; 130,3; 130,8; 131,6; 132,8; 137,5; 143,2; 145,3; 151,1; 151,1; 167,4; 168,0.

2.3.8. Tentativa de preparação de complexos de Fe^{3+} e Cu^{2+}



Dissolveu-se o conjugado **10** (16,9 mg) em metanol (3 mL) e adicionou-se FeCl_3 (1,6 mg) e KOH (1 mL). Colocou-se a mistura sob atmosfera de árgon durante a noite e sob agitação. Após esse período de tempo refluxou-se a mistura durante 3 h. Precipitou-se o complexo por difusão usando éter etílico.

Dissolveu-se o conjugado **10** (12,9 mg) em metanol (2 mL) e adicionou-se $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,7 mg) e KOH (1 mL). Colocou-se a mistura sob atmosfera de árgon durante a noite e sob agitação. Após esse período de tempo refluxou-se a mistura durante 3 h. Precipitou-se o complexo por difusão usando éter etílico.

2.4. Estudo das propriedades fotofísicas

Os espectros de UV-Vis foram obtidos usando cubas de quartzo de 1 cm à temperatura constante de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. As soluções dos ligandos foram preparadas em DMSO e diluídas para os solventes em estudo: CH_2Cl_2 , EtOH, MeOH e DMSO/ H_2O (30%) usando concentrações compreendidas no intervalo de 10^{-5} - 10^{-7} M. Tendo-se determinado previamente a lei de Beer-Lambert (absorção) para cada solvente e verificado a inexistência de interferência por parte dos solventes na emissão.

Os espectros de fluorescência foram também recolhidos em cubas de quartzo de 1 cm a temperatura constante $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, com fendas de 5 nm, usando λ_{exc} apropriados para os solventes CH_2Cl_2 , EtOH, MeOH e DMSO/ H_2O (30%). Para minimizar os efeitos de reabsorção, os valores de absorvância das amostras foram mantidas abaixo de 0,1.⁸

2.4.1. Determinação de rendimentos quânticos

Os rendimentos quânticos foram determinados de acordo com o procedimento descrito na literatura^{29,30}, usando como padrão a rodamina B, devido às suas semelhanças com os compostos preparados. A solução padrão de rodamina B encontrava-se preparada previamente em etanol com concentração de $1,17 \times 10^{-3}$ M.

As soluções dos diferentes compostos foram preparadas a partir de uma solução-mãe mais concentrada em DMSO. Preparou-se uma solução com absorvância de 0,5 e a partir dessa preparou-se por diluição as restantes de modo a se obterem soluções numa gama de absorvância de 0,05-0,03. Após a obtenção das soluções nessa gama traçaram-se os respetivos espectros de emissão.

Para o cálculo do rendimento quântico utilizou-se a seguinte expressão:

$$\Phi_F(Ros) = (A_p/A_{Ros}) (F_{Ros}/F_p) (n_{Ros}/n_p)^2 \Phi_F(p)$$

Onde, Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência, A é a absorvância, F a área sob a curva de emissão corrigida (expressa em número de fótons) e n o índice de refração do solvente utilizado. Tendo-se determinado, quando necessário, o índice de refração das misturas de solvente.

2.4.2. Estudo de variação do espectro do UV-Vis com o pH e com a adição de Fe(III)

Foi preparada uma solução *stock* do conjugado **10** em H₂O/DMSO (10%) com a concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ M (em 50 mL). Ajustou-se a força iónica dessa solução com 10% de uma solução de 0,1 M de NaCl. Retiraram-se alíquotas independentes de 3 mL para uma célula de paredes duplas termoequilibrada à temperatura de 25°C, e fez-se o ajuste de pH para valores entre 2-12. Esses ajustes foram efetuados com a adição de quantidades vestigiais de soluções HCl e NaOH. Após o ajuste a solução foi transferida para a cuba e obteve-se o respetivo espectro de absorvância. Voltou-se a verter o conteúdo da cuba na célula de paredes duplas e adicionou-se a quantidade estequiométrica de uma solução de nitrato de ferro(III) nona hidratado (50 µL com uma $c=1,0$ M), adquiriu-se novamente o espectro de absorvância para se verificar a potencial existência de alterações. Os espectros foram adquiridos entre a gama de comprimento de onda de 270-900 nm. Um procedimento semelhante foi realizado para o conjugado **12**.

Para a medição dos valores de pH foi usado o equipamento *Crison pH meter Basic 20+* que se encontra equipado com eletrodo de vidro e estabilizado a 25°C usando soluções padrão de pH 4, 7 e 9.

2.4.3. Estudo da variação do espectro de fluorescência com a adição de Fe(III)

As medições de fluorescência foram realizadas em soluções tampão de MOPS (pH 7,4, 10 mM e 0,1 M de NaCl) à temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ usando cubas de 1 cm com comprimento de fendas de 5 nm de excitação e emissão, considerando para cada composto o λ_{exc} apropriado. Foi preparada uma solução *stock* de Fe(III) a partir do reagente $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3]$ da Sigma-Aldrich e estabilizada com o sal do ácido nitriloacético trisódico (NTA) na proporção de 1:5. As soluções de ligandos foram preparadas por diluição de um volume conhecido da sua solução *stock* em DMSO numa solução tampão de MOPS de concentração final 2 μM . A percentagem de DMSO presente na solução aquosa foi sempre mantida inferior a 1% do volume total. Às soluções dos ligandos são depois adicionadas quantidades crescentes de metal da solução *stock* preparada, numa gama de razões molares entre 10:1 e 1:3. Sendo a intensidade de fluorescência sempre corrigida em termos de diluição.

CAPÍTULO III

Resultados e discussão

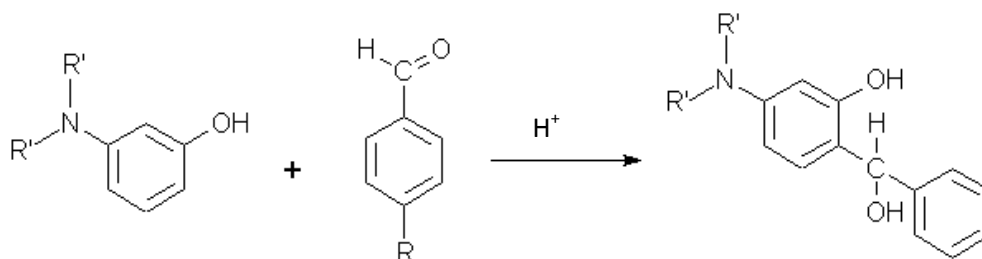
3. Resultados e Discussão

3.1. Considerações gerais

A metodologia geral de síntese de rosaminas envolveu a reação de condensação de um benzaldeído *para* substituído com 3-dietilaminofenol na proporção de 1:2, na presença de uma quantidade catalítica de *p*-TsOH, utilizando ácido propiônico ou água como solvente, seguindo-se uma etapa de oxidação com cloranil. As várias etapas de reação foram seguidas e controladas por TLC.

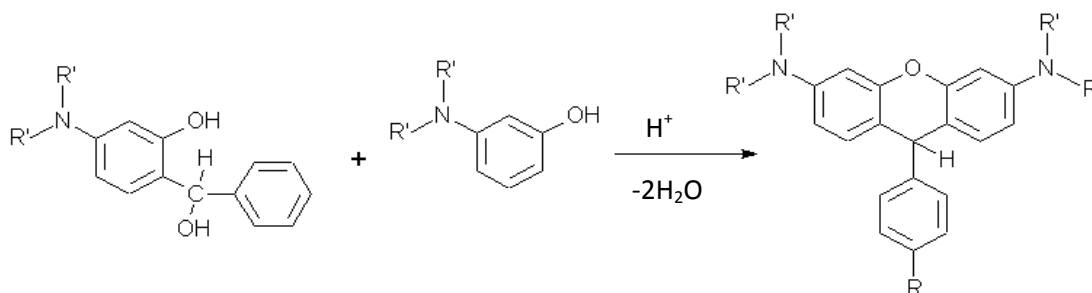
À semelhança do mecanismo de síntese da rodamina B, a síntese de rosaminas deverá envolver três etapas. A primeira etapa envolve a formação de um carbocátion por protonação do átomo de oxigénio do grupo carbonilo do benzaldeído, no qual esse carbocátion irá reagir com o fenol substituído através de uma reação de substituição eletrofílica aromática.

Etapa 1



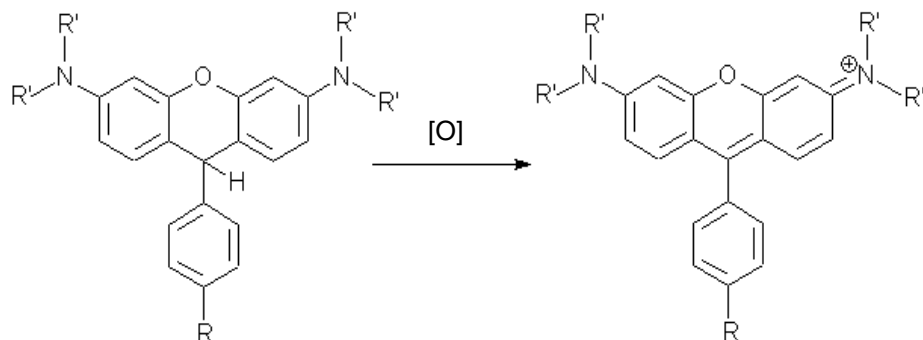
O intermediário formado é protonado e gera um novo carbocátion que irá sofrer uma nova reação de substituição eletrofílica. O átomo de oxigénio do anel aromático adjacente sofre um ataque nucleofílico ao carbocátion formado, gerando uma nova ligação éter entre os dois anéis aromáticos. Através da desidratação, o carácter aromático do anel será restabelecido, levando à formação do anel xanteno.

Etapa 2



A posterior oxidação do anel formado conduz à síntese da estrutura da rosamina.

Etapa 3



Geralmente estas reações de substituição eletrofílica aromática requerem o uso de temperaturas de reação elevadas. O aquecimento pode ser feito recorrendo ao método de aquecimento convencional (banho de óleo) ou aquecimento por radiação micro-ondas.

No aquecimento convencional o calor é transferido por condução da resistência do equipamento, da placa de aquecimento para o banho de óleo e deste por sua vez para o balão, no qual decorre a reação. Para um maior controlo de temperatura e segurança implementou-se um termopar no equipamento. Aplicou-se um condensador ao balão permitindo que os vapores gerados no decurso da reação não fossem libertados para a atmosfera, mas que condensassem e regressassem ao interior do balão. A figura seguinte (Figura 3.1) representa este método de aquecimento.

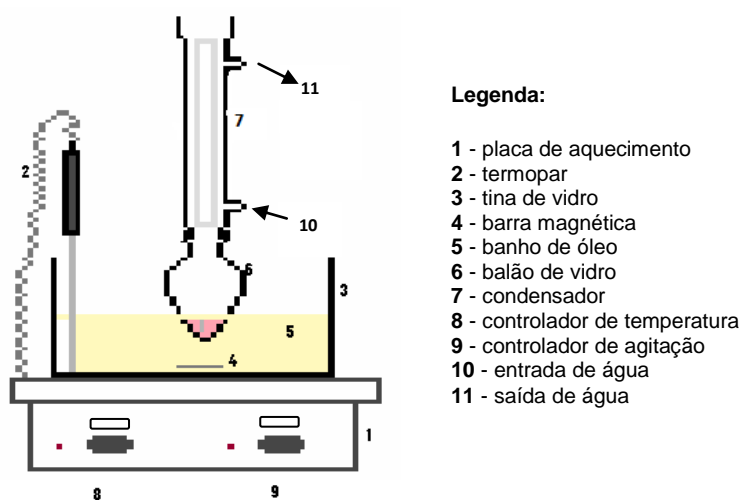


Figura 3.1. Esquema representativo do método de aquecimento convencional.

Já o aquecimento micro-ondas processa-se por irradiação da mistura reacional com um feixe de radiação eletromagnética, causando a oscilação das moléculas presentes gerando calor. O aquecimento por micro-ondas é também designado por aquecimento dielétrico, existindo dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em

calor. O primeiro mecanismo é chamado de *rotação de dipolo* e encontra-se relacionado com o alinhamento das moléculas com o campo elétrico aplicado. Após a remoção deste campo elétrico as moléculas voltam ao seu estado desordenado e a energia que foi absorvida é dissipada na forma de calor. O segundo mecanismo é designado por *condução iónica*, no qual o calor é gerado através das perdas por fricção que acontecem devido à migração de iões dissolvidos na solução quando expostos à ação do campo elétrico. As perdas verificadas dependem do tamanho, carga, condutividade dos iões dissolvidos e bem como a sua interação com o solvente.

A capacidade na qual uma substância converte a radiação electromagnética em calor a uma dada temperatura e frequência é chamada de fator de dissipação ($\tan \delta$) e é estimada pelo seguinte quociente:

$$\tan \delta = \varepsilon''/\varepsilon'$$

Sendo ε'' o fator de perda dielétrica que mede a eficiência da conversão de energia eletromagnética em calor e ε' é a constante dielétrica da substância que indica a sua polaridade.

Este método de aquecimento tem inúmeras vantagens, como tempos de reação mais curtos; aquecimento rápido e uniforme, uma vez que este é direcionado para a mistura reacional, sendo possível atingir temperaturas elevadas em poucos segundos; maior reprodutibilidade, uma vez que é possível o controlo da pressão e temperatura ao longo da execução; menores perdas de energia devido ao facto da reação se desenrolar em vaso fechado e uso de solventes com baixos pontos de ebulição, podendo estes serem usados sob pressão em condições de vaso fechado e a temperaturas mais elevadas do que seus pontos de ebulição. Como desvantagens são de salientar reações difíceis de controlar, uma vez que não se tem um controlo visual do que se passa no vaso reacional, o equipamento e seus acessórios são dispendiosos e a baixa eficiência do magnetirão.

O micro-ondas usado nas reações efetuadas no presente trabalho foi o reator de micro-ondas de cavidade monomodo do modelo *CEM Discover* (Figura 3.2). Este equipamento é muito completo o que permite controlar a temperatura de um modo direto na mistura reacional, utilizando um sensor interno de fibra ótica, um externo de infravermelho, um agitador magnético e um *software* capaz de controlar a pressão e a potência pretendidas.



Figura 3.2. Micro-ondas *CEM Discover*.

Na Tabela 5 resumam-se as vantagens e desvantagens do aquecimento convencional comparativamente ao aquecimento por micro-ondas.

Tabela 5. Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de aquecimento.

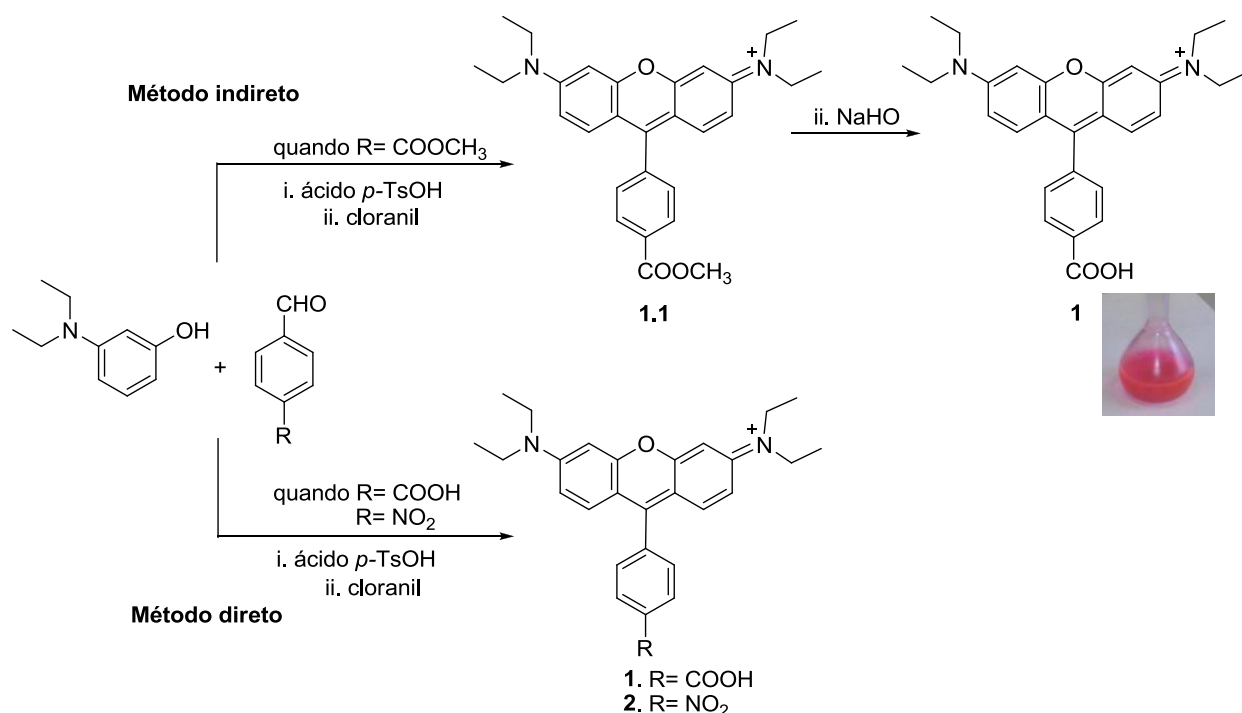
Método de aquecimento	Vantagens	Desvantagens
Convencional	<ul style="list-style-type: none">• Reações mais fáceis de controlar	<ul style="list-style-type: none">• Tempos de reação longos• Rendimentos mais baixos• Aquecimento mais lento
Micro-ondas	<ul style="list-style-type: none">• Tempos de reação mais curtos• Aquecimento rápido e uniforme• Maior reprodutibilidade• Uso de solventes com baixos pontos de ebulição	<ul style="list-style-type: none">• Reações difíceis de controlar• Equipamento dispendioso• Baixa eficiência do magnetrão

Como já se referiu, o aquecimento por micro-ondas possibilita o uso de tempos de reação mais curtos, no entanto, estamos a trabalhar com uma escala de síntese pequena, quando se passa para uma escala maior o tempo de reação provavelmente aumentará. Logo a eficiência energética deste dois métodos terá de ser avaliada para cada caso individualmente.

3.2. Síntese de precursores

Na síntese de rosamina **1** ($R=COOH$) (ver Esquema 3.1 foram testados dois métodos: 1- método indireto e 2- método direto.

O método indireto de síntese de rosamina **1** consistiu na reação de condensação de 4-formilbenzoato de metilo com 3-dietilaminofenol, na presença de uma quantidade catalítica de *p*-TsOH em ácido propiónico. Esta reação foi realizada recorrendo ao aquecimento por radiação micro-ondas em vaso fechado (80°C, 10 min). Após o período de irradiação, seguiu-se a etapa de oxidação com cloranil. Esta etapa também foi realizada com recurso ao aquecimento por radiação micro-ondas, em vaso fechado, mas utilizando uma temperatura ligeiramente mais baixa (60°C, 10 min). A mistura resultante foi posteriormente purificada por coluna rápida de cromatografia em sílica gel, obtendo-se a rosamina **1.1** ($R=CO_2CH_3$) com rendimento de 30% (Tabela 6., Entrada 1). Na etapa final procedeu-se à hidrólise do éster metílico, usando uma solução de NaOH, metanol e água recorrendo novamente à radiação por micro-ondas em vaso fechado (80°C, 10 min). Após terminar a reação neutralizou-se o NaOH com HCl diluído e procedeu-se à extração do composto com clorofórmio. Obtendo-se a rosamina **1** com rendimento de 47%, após purificação por coluna rápida de cromatografia.



Esquema 3.1. Síntese da rosamina **1.1**, **1** e **2**.

A síntese da rosamina **1** através do método direto consistiu na reação de ácido 4-formilbenzóico com 3-dietilaminofenol, na presença de uma quantidade catalítica de *p*-TsOH. Neste método testaram-se dois solventes, ácido propiónico e água. Tal como na síntese anterior, a reação foi irradiada no micro-ondas, seguindo-se a etapa de oxidação com cloranil. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 6 e revelam que tanto em ácido propiónico (Entrada 2) como em água (Entrada 3), o rendimento obtido foi semelhante, sendo este de 47%. A reação em água é mais sustentável e económica uma vez que a água como solvente é inócua, e apresenta ainda a vantagem de proporcionar a precipitação do produto da reação, não sendo necessária a execução de extrações com clorofórmio. A água apresenta-se ainda como um solvente mais seguro, graças à sua elevada capacidade calorífica e estabilidade redox. É interessante verificar que, apesar dos reagentes serem insolúveis em água, a reação processa-se em suspensão aquosa, sem necessitar da adição de co-solvente nem de agente de transferência de fase.^{31,32,33} A rosamina **1** exibe cor rosa e na presença da luz UV a 254 nm emite fluorescência de cor laranja como se pode observar na figura do Esquema 3.1.

A rosamina **2** (R = NO₂) foi sintetizada recorrendo à mesma via de síntese descrita anteriormente em água, mas usando neste caso 4-nitrobenzaldeído e aumentando a temperatura para 100°C. O método de aquecimento usado foi por radiação de micro-ondas, mas em modo de vaso aberto, uma vez que as quantidades de reagentes usados nesta síntese

foram superiores. Após purificação por cromatografia rápida, foi possível isolar o produto pretendido com um rendimento de 79% (Tabela 6., Entrada 4).

Tabela 6. Resultados obtidos na síntese das rosaminas *para* substituídas .

Entrada	Rosamina	R	Solvente	T/°C	t/ min	Rendimento (%)
1	1.1	CO ₂ CH ₃	ácido propiónico	80	10	30
2	1	CO ₂ H	ácido propiónico	80	10	47
3	1	CO ₂ H	Água	80	10	47
4	2	NO ₂	Água	100	10	79

3.2.1. Síntese de derivados de rodamina 1-5

Para a obtenção do fluoróforo designado por rosamina **3** (R=NH₂) foi necessária a redução do grupo – NO₂ da rosamina **2**. Foram testadas várias metodologias a fim de se encontrar a melhor para a sua síntese.

Uma das metodologias já testadas anteriormente envolveu utilização do método de hidrogenação (ver Esquema 3.2).

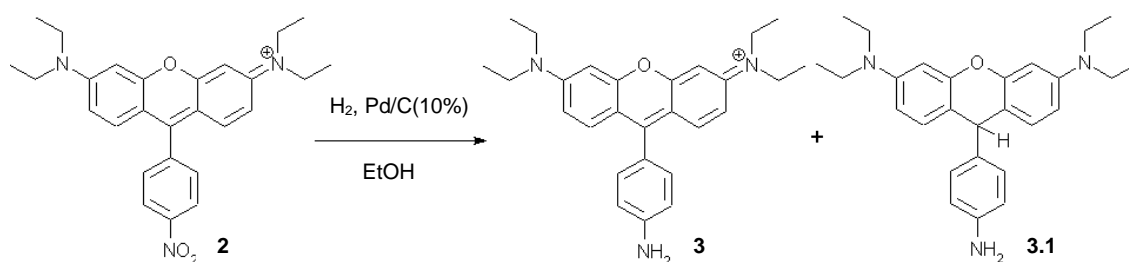
Nesta reação preparou-se uma solução de rosamina **2**, em etanol e adicionou-se uma quantidade catalítica de Pd/C (10%). Posteriormente a mistura foi colocada sob atmosfera de hidrogénio à pressão de 5 bar durante 18 h. A mistura obtida foi caracterizada por RMN, verificando-se a formação de uma mistura de dois compostos um referente à rosamina **3** e outro referente à sua forma reduzida, **3.1**, resultante da introdução de um átomo de hidrogénio na posição 9 do anel xanteno (ver Tabela 7, Entrada 1).

De acordo com a literatura consultada,^{34,35,36} a redução do grupo nitro a amina é bem sucedida quando o H₂ é gerado *in situ* a partir de reagentes como 1,4-ciclohexadieno, 1-metil-1-ciclohexeno ou ciclohexeno na presença de Pd/C como catalisador. Baseando-nos nestas abordagens realizaram-se testes usando diferentes condições e proporções de ciclohexeno. Num primeiro ensaio usou-se uma proporção de rosamina **2**/ciclohexeno de 1:2 sob aquecimento por micro-ondas (20 min, 100°C, 100 W). Terminada a reação, filtrou-se o Pd/C e evaporou-se o solvente. Analisou-se o resíduo obtido por TLC e RMN de ¹H e verificou-se a existência de uma mistura de dois componentes, referentes à rosamina **2** e à rosamina **3**. Calculando os rendimentos por RMN obteve-se de rosamina **3**, 59%, e de reagente de partida (rosamina **2**), 41% (ver Tabela 7, Entrada 2). Num segundo ensaio, e partindo do mesmo procedimento, aumentou-se a temperatura da reação para 130°C, com o objetivo de gerar mais hidrogénio e baixou-se a potência máxima para 50 W, por motivos de segurança, (dado

estarmos a trabalhar com pressões da ordem dos 21 psi). A razão das proporções de ciclohexeno/rosamina **2** foram mantidas. Por análise de RMN de ^1H verificou-se a existência de 71% de rosamina **3** e 29% de rosamina **2**. Após purificação por placas de cromatografia, obteve-se 46% de rosamina **3** (ver Tabela 7, Entrada 3). O terceiro ensaio consistiu no aumento da proporção de rosamina **2**/ciclohexeno 1:3. Obteve-se por análise de RMN conversão total do reagente de partida no fluoróforo final. Através de purificação por cromatografia de coluna rápida, a rosamina **3** foi isolada com rendimento de 66% (ver Tabela 7, Entrada 4).

Também foi testado um outro método de redução utilizando o estanho em pó. Este consistiu em transferir uma solução de rosamina **2** em clorofórmio ao qual se adicionou estanho em pó e ácido clorídrico. Deixou-se a mistura reagir durante 2h30min, sob agitação e à temperatura ambiente. Após terminar a reação procedeu-se à sua neutralização usando uma solução saturada de bicarbonato de sódio, extraíndo-se o produto pretendido com uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1). Purificou-se este por cromatografia rápida obtendo-se a rosamina **3** com 19% de rendimento (ver Tabela 7, Entrada 5). Face a este rendimento decidiu-se reduzir a quantidade usada de estanho em pó para cerca de metade, a fim de melhorar a síntese, porém o rendimento obtido foi ainda inferior (9%) (ver Tabela 7, Entrada 6).

Estes resultados permitem concluir que a redução do grupo nitro a amina usando ciclohexeno como gerador de hidrogénio é mais vantajoso, porque além de melhorar o rendimento da reação (de 19% para 66%), permite ainda reduzir o tempo da reação (de 2h30min para 20 min).



Esquema 3.2. Síntese da rosamina **3** ($\text{R}=\text{NH}_2$), pelo método de hidrogenação.

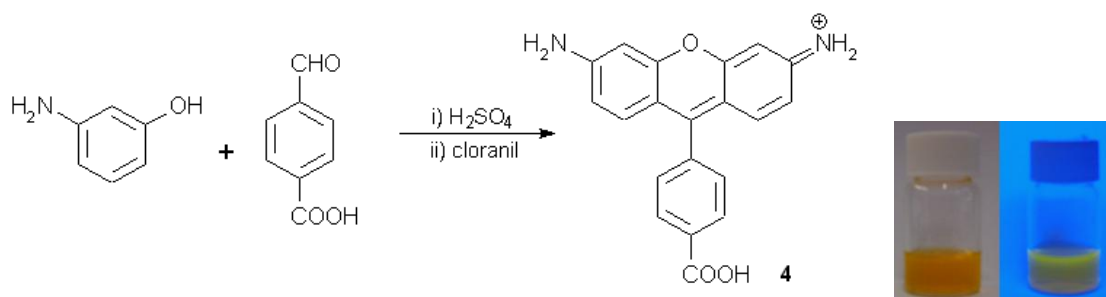
Tabela 7. Resultados obtidos na síntese da rosamina **3** ($\text{R}=\text{NH}_2$).

Entrada	Métodos de hidrogenação	t	T/°C	Potência máxima / W	Rendimento (%) por RMN	Rendimento (%)
1	H_2	18h	ambiente	-	35/ 65*	-
2	Ciclohexeno (2 equiv)	20 min	100	100	59	**
3	Ciclohexeno (2 equiv)	20 min	130	50	71	46
4	Ciclohexeno (3 equiv)	20 min	130	50	100	66
5	Estanho em pó	2h30min	ambiente	-	-	19
6	Estanho em pó	2h30min	ambiente	-	-	9

* Forma reduzida, **3.1**

** mistura complexa

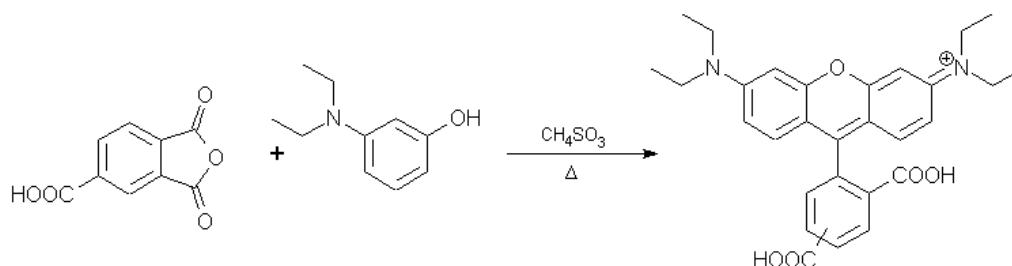
A síntese da rosamina **4** (ver Esquema 3.3) envolveu a preparação de uma mistura contendo 3-aminofenol, ácido 4-formilbenzóico e clorofórmio. Após evaporação do solvente com recurso ao evaporador rotativo, suspendeu-se a mistura em H₂SO₄ (60%) frio e colocou-se sob aquecimento à temperatura de 150°C e agitação. Posteriormente procedeu-se à oxidação usando cloranil e após a oxidação adicionou-se metanol e carbonato de potássio anidro a fim de ser possível a extração do composto. Note-se que o composto mostrou ser muito difícil de solubilizar nos solventes orgânicos usuais tais como CHCl₃, CH₂Cl₂, tendo mostrado maior afinidade para o metanol. Filtrou-se e evaporou-se o solvente, de seguida efetuou-se a purificação em coluna de cromatografia rápida usando como eluente clorofórmio/metanol (7:3), verificando-se por TLC que esta purificação por coluna não tinha sido suficiente para isolar o composto pretendido puro. De seguida procedeu-se a uma segunda coluna de cromatografia rápida, tendo-se obtido a rosamina **4** com rendimento de 1%. Este baixo valor de rendimento deve-se, por um lado, à baixa solubilidade do composto em solventes orgânicos e por outro lado ao facto da reação poder dar origem a outros produtos nomeadamente a derivados imina resultantes do ataque do grupo amina ao aldeído. Quando comparada com a rosamina **1** verificou-se que a alteração dos grupos etilos por hidrogénios nas posições 3 e 6 do anel xanteno influenciou a coloração exibida desta rosamina passando a ter cor amarela e quando exposta à luz UV a 254 nm emitiu fluorescência amarela.



Esquema 3.3. Síntese da rosamina **4**.

Na síntese da rodamina **5** (ver Esquema 3.4) recorreu-se a um protocolo já descrito na literatura⁹, envolvendo a reação de anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico com o 3-dietilaminofenol em ácido metanosulfónico sob aquecimento a 165°C durante 3,5 h. O aumento do aquecimento até 165°C foi progressivo e lento uma vez que a reação é fortemente exotérmica, evitando assim possíveis acidentes. Deixou-se arrefecer a mistura até à temperatura ambiente e verteu-se esta numa mistura de água e gelo, de forma a diluir o ácido seguindo-se extrações da fase orgânica usando diclorometano/metanol (9:1). O resíduo obtido foi posteriormente purificado por coluna de cromatografia, tendo-se obtido a rodamina **5** (mistura de isómeros 4' e 5') com rendimento de 6%. Esta purificação também foi difícil de

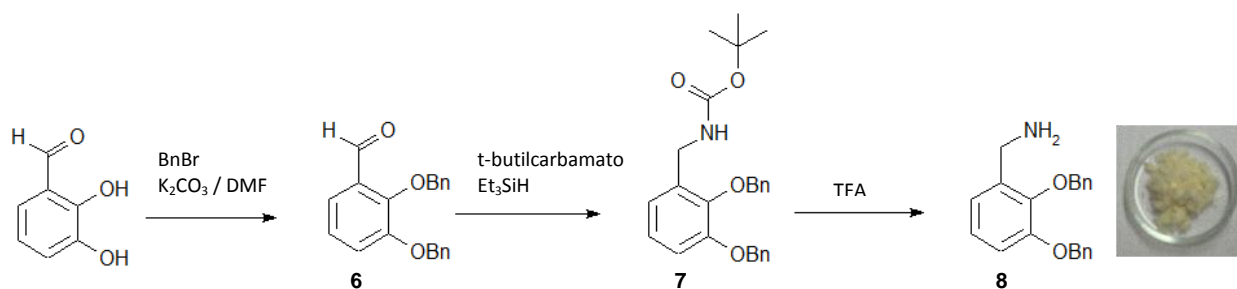
efetuar devido a impurezas que se encontravam muito próximas do composto que se pretendia isolar. Recuperou-se uma quantidade bastante significativa de 3-dietilaminofenol, o que significa que a reação não foi completa e provavelmente deverá necessitar de mais tempo de aquecimento.



Esquema 3.4. Síntese da rodamina 5.

3.2.2. Síntese de catecolatos precursores 6-8

Para a obtenção dos conjugados de rodamina–catecol foi necessário sintetizar o precursor 2,3-dibenziloxibenzilamina **8** (ver Esquema 3.5). Este é um dos precursores do acoplamento que irá conduzir à formação dos quimiossensores fluorescentes **10** e **15**. Na primeira etapa partiu-se do composto 2,3-dihidroxibenzaldeído e procedeu-se à proteção dos grupos hidroxilo adicionando o brometo de benzilo à temperatura de 0°C, na presença de carbonato de potássio como base. Como solvente usou-se a DMF e a reação permaneceu durante 4 h sob agitação e atmosfera de árgon. O produto obtido **6** foi precipitado sob água e gelo, filtrado e seco. Na segunda etapa adicionou-se ao produto obtido *t*-butilcarbamato e trietilsilano permanecendo a reação durante 5 h sob agitação e à temperatura ambiente. A terceira e última etapa da síntese envolveu um passo de hidrólise usando para o efeito o ácido trifluoroacético durante 15 min à temperatura ambiente e sob agitação. Após purificação por coluna de cromatografia o composto **8** foi obtido com rendimento de 38%, sendo este valor inferior ao obtido na literatura.²⁸



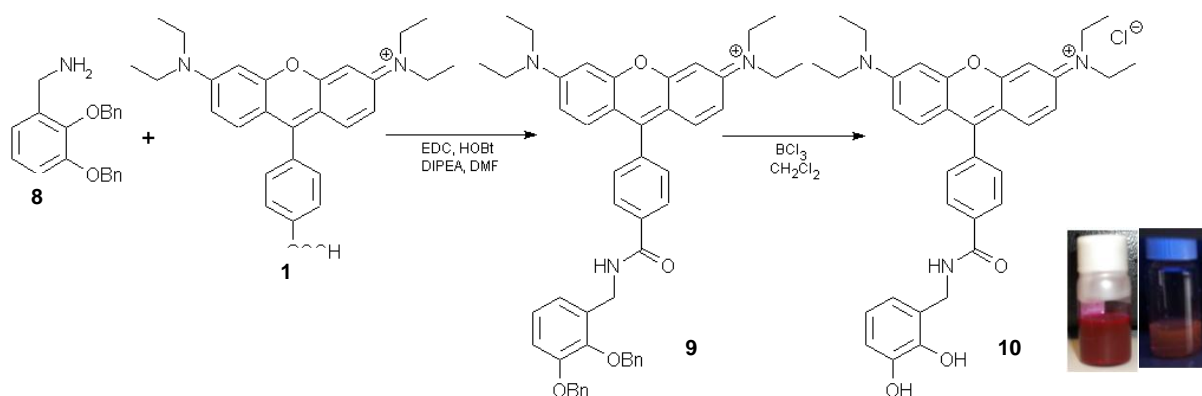
Esquema 3.5. Síntese do precursor – 2,3-dibenziloxibenzilamina **8**.

3.3. Síntese de conjugados rodamina–catecol

3.3.1. Síntese dos conjugados 9-12

O conjugado **9** (ver Esquema 3.6) foi preparado recorrendo à reação de condensação entre a rosamina **1** ($R=CO_2H$) e 2,3-dibenziloxibenzilamina **8** na proporção de 1:2, na presença de diferentes agentes de acoplamento³⁷, uma base – a DIPEA e como solvente a DMF. As reações foram efetuadas usando o aquecimento por micro-ondas em modo de vaso fechado, nas seguintes condições: 100 W de potência máxima, 1 min de rampa, 20 min de tempo de reação à temperatura de 75°C. Na purificação recorreu-se à cromatografia de coluna rápida. As reações foram realizadas testando agentes de acoplamento diferentes. Foi testado o par de agentes de acoplamento – EDC/HOBt, obtendo-se rendimento de 77% para o conjugado **9** (ver Tabela 8, Entrada 1). Num outro ensaio foi usando o agente de acoplamento COMU (hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxidimetilamino-morfolino-carbenio), muito utilizado como reagente de acoplamento na síntese de peptídeos. Este apresenta como principais vantagens ser um reagente estável, seguro, de fácil remoção e limpo, uma vez que os produtos secundários das reações podem ser removidos, pois são solúveis em água.^{38,39,40} Esta síntese foi efetuada em condições semelhantes à anteriormente descrita, após término da reação por micro-ondas efetuaram-se extrações com clorofórmio, adicionando primeiro água para dissolver possíveis produtos secundários. Também por comparação dos TLC das duas sínteses, esta é a que origina menor quantidade de impurezas. Apesar das inúmeras vantagens que este reagente de acoplamento possui, o rendimento obtido na síntese foi apenas de 20% para o conjugado **9** (ver Tabela 8, Entrada 2). Tendo em conta que um dos principais objetivos deste trabalho envolveu o desenvolvimento de metodologias mais sustentáveis e eficientes poder-se-á propor para trabalhos futuros a reação de condensação de ácidos e aminas em água ou em álcoois, utilizando como agentes de acoplamento DMT-MM.⁴¹

A desproteção dos grupos benzilo, usando para isso BCl_3 em CH_2Cl_2 durante 18 h sob atmosfera de argon, em banho de gelo, obtendo-se o conjugado **10** com rendimento de 68%. Na figura do Esquema 3.6 também se pode observar uma solução em DMSO de cor rosa alaranjado de conjugado **10** que após exposição à luz de UV a 254 nm emitiu fluorescência laranja.



Esquema 3.6. Síntese dos conjugados **9** e **10**, usando o par de agentes de acoplamento EDC/HOBt.

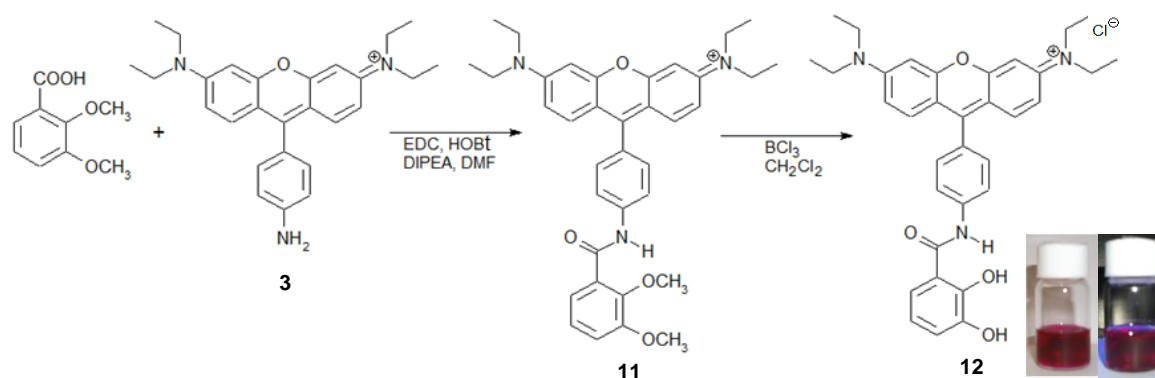
A síntese do conjugado **11** (ver Esquema 3.7), tal como a anterior, partiu de uma reação de condensação entre a rosamina **3** e o ácido 2,3-dimetoxibenzoico, na proporção de 1:2, na presença do par de agentes de acoplamento - EDC/HOBt e como base a DIPEA em DMF. Tal como no ensaio anterior, este ensaio também foi realizado usando aquecimento por micro-ondas nas mesmas condições acima citadas. Após a purificação por cromatografia rápida, obteve-se 45% de rendimento do composto **11** (ver Tabela 8, Entrada 3).

Inicialmente a desproteção dos grupos metoxilo foi efetuada à semelhança de **9**, com 18 h de reação, mas após análise por RMN verificou-se que só um dos grupos metoxilo se encontrava desprotegido, logo foi necessário repetir esta reação para promover a remoção do restante grupo, sendo esta ideia fomentada pela referência.⁴² Após repetição da reação de desproteção com CH_2Cl_2 e BCl_3 por mais 18 h e posterior análise por RMN verificou-se a remoção total dos grupos. Por dissolução de **12** em DMSO obteve-se uma solução de cor rosa avermelhado que após exposição à luz de UV a 254 nm emitiu coloração laranja fluorescente sendo esta fluorescência de menor intensidade comparativamente com a do conjugado **10**, como se pode observar na figura do Esquema 3.7.

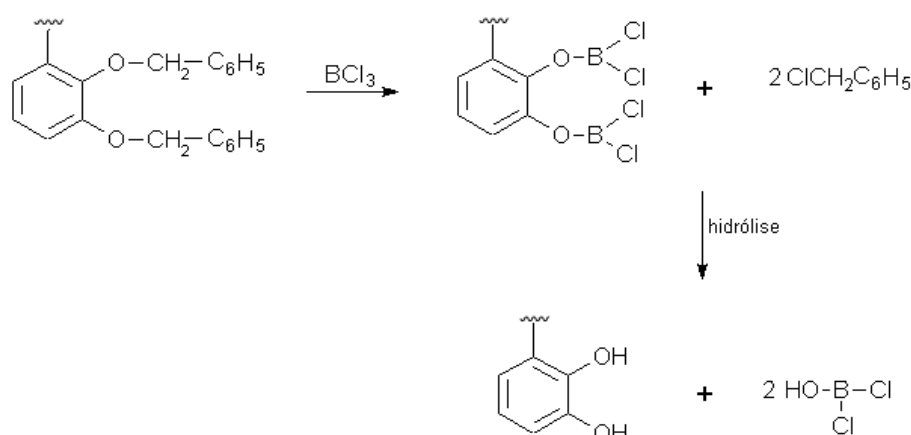
No Esquema 3.8 apresenta-se a reação de desproteção dos grupos benzilo na unidade do catecolato usando BCl_3 . O BCl_3 é um ácido de Lewis, que tem a capacidade de coordenar aos átomos de oxigénio de ligações éter de modo a promover a clivagem da ligação C-O para formar brometo de alquilo que posteriormente será hidrolisado a álcool.

Tabela 8. Resultados obtidos na síntese dos conjugados **10** e **12**, com diferentes agentes de acoplamento.

Entrada	Conjugado	Agentes de acoplamento	Base	T/°C	t/ min	Rendimento (%) -OBn/-OCH ₃	Rendimento (%) -OH
1	10	EDC/HOBt	DIPEA	75	20	77	68
2		COMU	DIPEA	75	20	20	68
3	12	EDC/HOBt	DIPEA	75	20	45	23

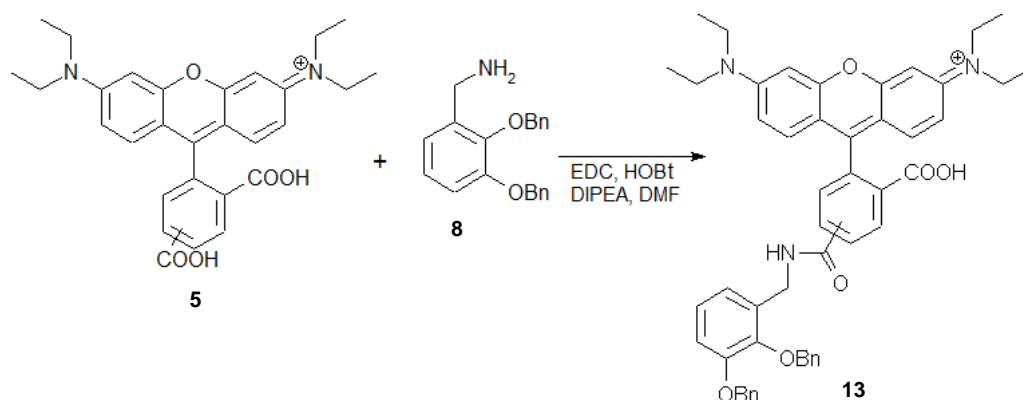


Esquema 3.7. Síntese dos conjugados 11 e 12.

Esquema 3.8. Desproteção dos grupos benzilo na unidade do catecolato com BCl_3 .

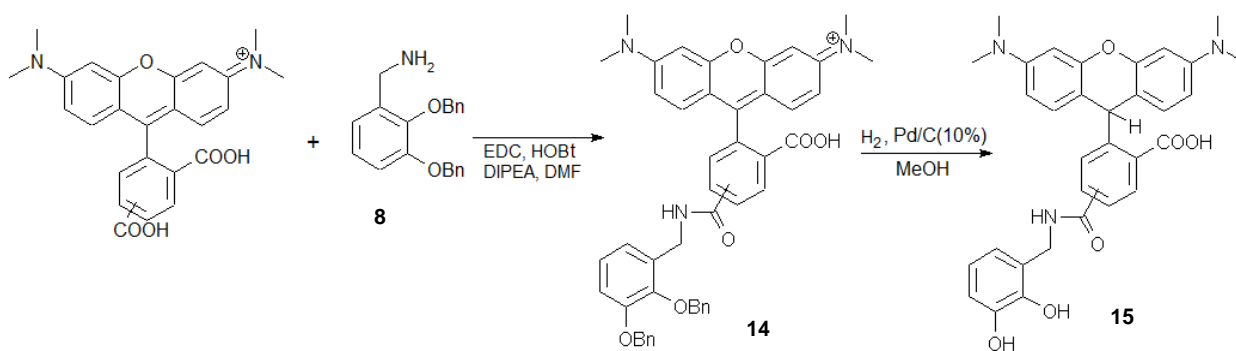
3.3.2. Síntese dos conjugados 13-15

A síntese do conjugado **13** consistiu numa reação de condensação entre a rodamina **5** e 2,3-dibenziloxibenzilamina **8** na proporção de 1:2, usando como agentes de acoplamento o EDC/HOBt e como base a DIPEA em DMF (Esquema 3.9). O método de aquecimento usado foi a radiação por micro-ondas (75°C , 20 min). Após a purificação por coluna de cromatografia rápida e revelados os respetivos cromatogramas (TLC) obteve-se uma fração correspondente ao composto **13** com apenas 5,2 mg, que após estudos de RMN de ^1H se concluiu estar contaminada com material de partida que ficou por reagir - 2,3-dibenziloxibenzilamina. Neste caso não foi efetuada a remoção dos grupos protetores – grupos benzilo uma vez que a fração não se encontrava pura, e também porque a quantidade obtida foi demasiado pequena.



Esquema 3.9. Síntese do conjugado 13.

A preparação do conjugado **14** envolveu a reação da rodamina comercial - 5(6)-carboxitetrametilrodamina e 2,3-dibenziloxibenzilamina **8**, na proporção de 1:2, na presença do par de agentes de acoplamento EDC/HOBt, DIPEA como base em DMF (Esquema 3.10), sob aquecimento por radiação de micro-ondas (75°C, 20 min). A mistura obtida foi purificada por TLC preparativa usando o eluente clorofórmio/metanol (9:1) tendo-se conseguido a separação das duas frações de isómeros 4' e 5'. Os rendimentos obtidos foram baixos obtendo-se 12% para o isómero 4' e 11% para o isómero 5'. A desproteção dos grupos benzilo dos dois isómeros foi realizada preparando para isso uma solução de **14** em metanol, HCl e adicionando uma quantidade catalítica de Pd/C(10%) sob atmosfera de hidrogénio, à pressão de 5 bar e durante 5 h. Esta reação para além de permitir a remoção dos grupos benzilo, proporciona ainda a introdução de um hidrogénio na posição 9 do anel xanteno, obtendo-se o ligando **15**.



Esquema 3.10. Síntese dos conjugados 14 e 15.

3.3.3. Tentativa de preparação de complexos de Fe³⁺ e Cu²⁺

Foram realizadas tentativas de preparação de complexos de Fe³⁺ e Cu²⁺ para o conjugado **10**, com base na referência.⁴² As sínteses foram realizadas em metanol com FeCl₃ ou CuCl₂.H₂O, na presença de KOH. As reações foram deixadas a agitar à temperatura ambiente

durante a noite (16 h), seguindo-se um período de refluxo durante 3 h. Em ambos os casos precipitou-se o produto da reação por adição de éter etílico e procedeu-se à caracterização por espectrometria de massa e UV-Vis. Porém os resultados obtidos não foram conclusivos e pareciam revelar que permanecia muito ligando por complexar.

3.4. Caracterização estrutural

As estruturas das rosaminas e seus conjugados foram deduzidas pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e usando técnicas bidimensionais homo e heteronuclear (COSY, HSQC e HMBC). A técnica homonuclear de COSY permite a correlação de acoplamento entre ^1H - ^1H ; já a técnica bidimensional heteronuclear de HSQC possibilita a correlação de acoplamento heteronuclear através de uma ligação, nomeadamente entre ^1H - ^{13}C através da deteção de prótons, enquanto que a técnica de HMBC estabelece a correlação a longa distância entre carbonos e hidrogénios separados por mais de uma ligação, sendo na maioria dos casos observável a correlação de acoplamento envolvendo duas a três ligações.⁴³ Também foram realizadas análises elementares e espectrometria de massa. No caso dos conjugados **10** e **15** ainda se efetuou uma análise de difração de Raios-X de cristal único.

3.4.1. Caracterização estrutural dos precursores

Os espectros de RMN de ^1H da estrutura base das rosaminas **1.1**, **1** e **2** (ver Tabela 9) apresentam uma série de sinais típicos do anel xanteno como um tripleto ($J= 7,2$ Hz) a 1,26-1,37 ppm e um quarteto ($J= 7,2$ Hz) a 3,56-3,75 ppm correspondente à ressonância dos grupos etilo; um duplete ($J= 2,4$ Hz) a 6,73-6,98 ppm, respetivamente à ressonância dos prótons H-4, 5; um duplo duplete ($J= 9,6$ Hz e $J= 2,4$ Hz) entre 6,80-7,07 ppm, devido à ressonância dos prótons H-2, 7; e um duplete ($J= 9,6$ -9,2 Hz) a 7,22-7,36 ppm correspondente aos prótons H-1, 8. Já os sinais correspondentes à ressonância do anel fenilo na posição 9 do anel xanteno irão depender da natureza do substituinte.

Para os casos estudados $\text{R}=\text{CO}_2\text{CH}_3$, CO_2H e NO_2 , os sinais atribuídos para os prótons H-2', 6' aparecem a 7,49-7,68 ppm e os sinais atribuídos aos prótons H-3', 5' ocorrem a 8,27-8,52 ppm. No caso da rosamina **1.1** ($\text{R}=\text{CO}_2\text{CH}_3$) ainda é possível verificar um singuleto a 4,04 ppm referente ao grupo metoxilo ($-\text{OCH}_3$) (ver Figura 3.3 e Tabela 9).

A Figura 3.3 representa o espectro comparativo de RMN de ^1H da rosamina **1.1** ($\text{R}=\text{CO}_2\text{CH}_3$) e da rosamina **1** ($\text{R}=\text{CO}_2\text{H}$) onde é possível verificar a presença do grupo metoxilo na rosamina **1.1** e a sua ausência na rosamina **1**.

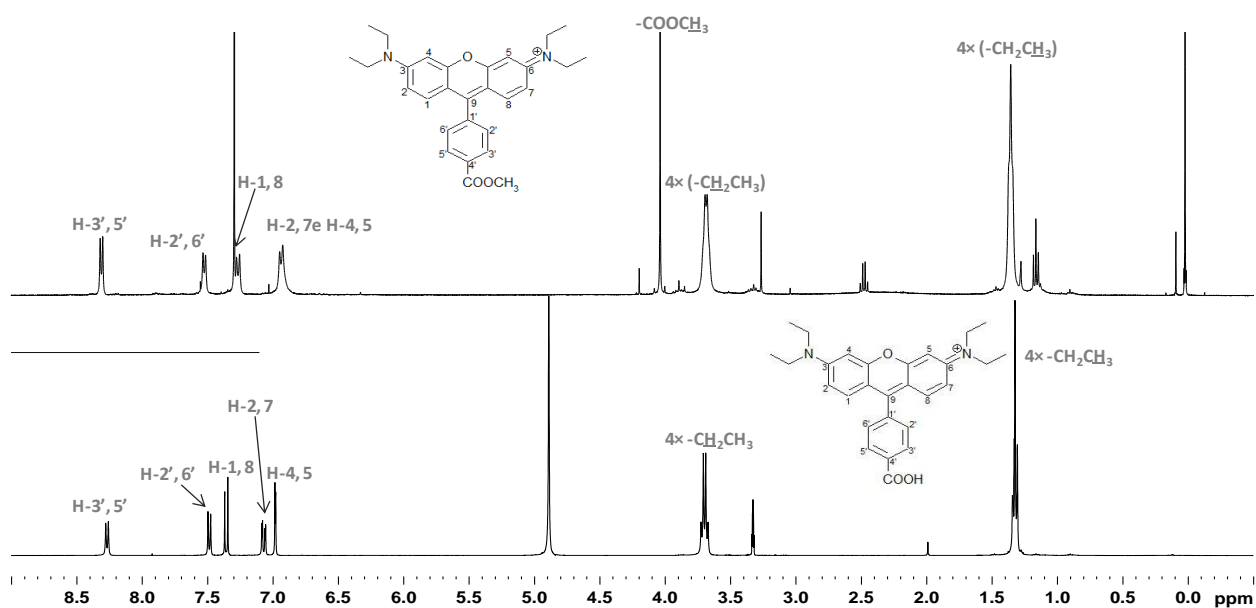


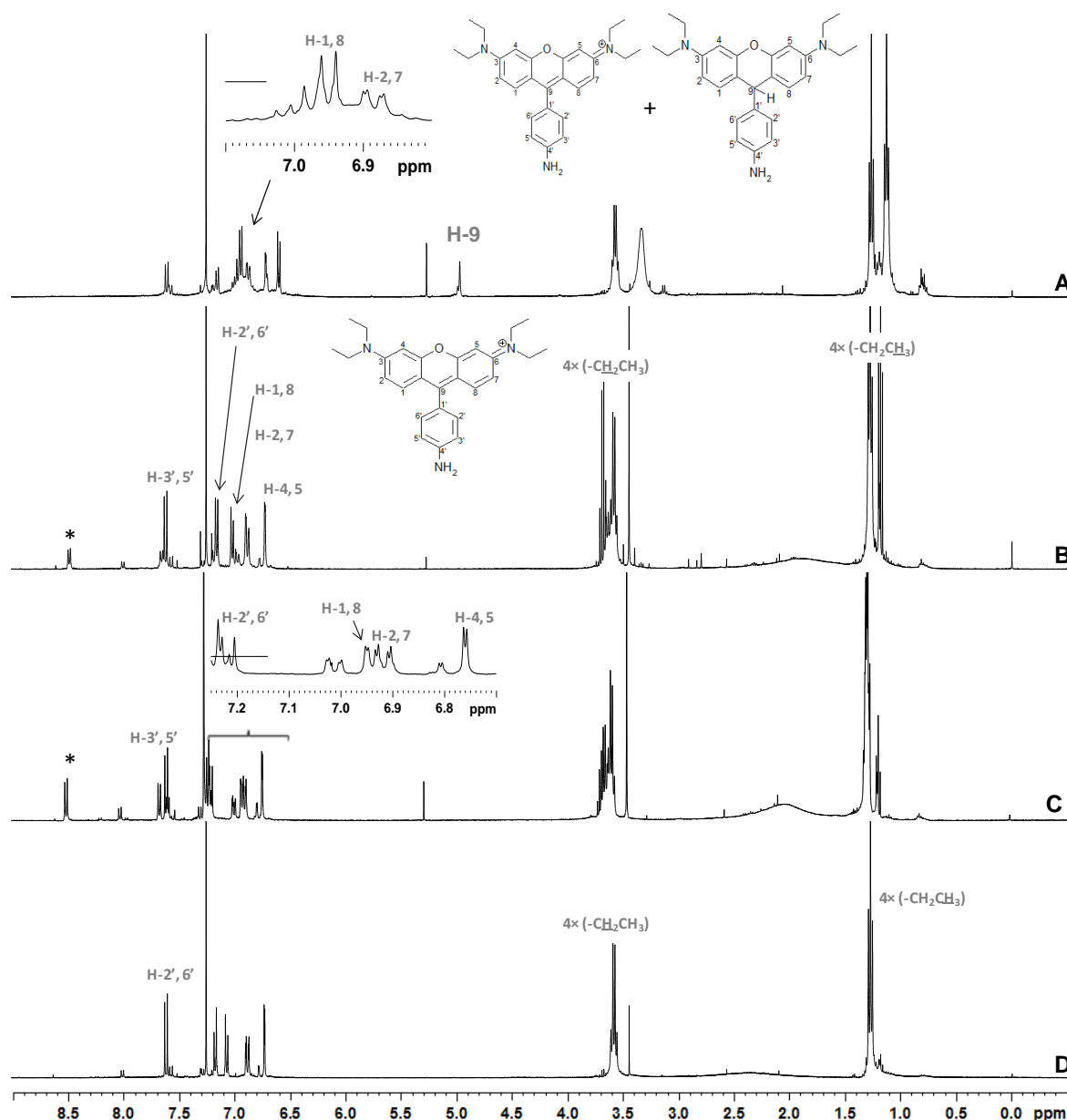
Figura 3.3. Espectros comparativos de RMN de ^1H . A - Rosammina 1.1 (em CDCl_3) e B – Rosammina 1 (em MeOD-d_4).

Tabela 9. Desvios químicos (δ/ppm) dos sinais obtidos pelos espectros de RMN de ^1H das rosaminas 1-3.

Rosamina	R	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$ t	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$ q	H-4, 5 d	H-2, 7 dd	H-1, 8 d	H-2', 6' d	H-3', 5' d	Outros sinais
1.1	COOMe	1,30-1,40*	3,62-3,75*	6,93 – 7,25	7,29	7,52	8,31	4,04	
1	COOH	1,32	3,70	6,98	7,07	7,36	7,49	8,27	-
2	NO_2	1,37	3,75	6,80	6,99	7,22	7,68	8,52	-
3	NH_2	1,26	3,56	6,73	6,80	6,94	7,08	7,60	-
3.1	NH_2 e H-9	1,37	3,64	6,63	6,75	6,97	6,89 - 7,05	7,64	5,02

*Aparecem como multipletos no espectro

A Figura 3.4 representa os espectros comparativos das sínteses da rosamina 3 e 3.1, para as diferentes metodologias testadas.



* sinal correspondente a H-3', 5' da rosamina **2** (R= NO₂).

Figura 3.4. Espetros comparativos de RMN de ^1H da rosamina **3**, em CDCl_3 usando diferentes metodologias de síntese. Em **A**, hidrogenação usando atmosfera de hidrogénio à pressão de 5 bar durante 18 h, **B** – usando ciclohexeno na proporção 1:2, 100 W de potência máxima e temperatura de 100°C em MW, **C** – usando ciclohexeno na proporção 1:2, 50 W de potência máxima e temperatura de 130°C em MW, **D** - usando ciclohexeno na proporção 1:3, 50 W de potência máxima e temperatura de 130°C em MW.

Na síntese da rosamina **3** foram testadas diferentes metodologias experimentais de modo a melhorar a performance da sua síntese. Uma das sínteses realizadas foi recorrendo à hidrogenação usando atmosfera de hidrogénio à pressão de 5 bar. Por análise do espectro de RMN de ^1H foi possível verificar a presença de dois compostos a rosamina **3** como era esperada e a sua forma reduzida, **3.1**, esta última presenciada pelo aparecimento de um singuleto a 5,02 ppm atribuído à ressonância do protão na posição 9 do anel xanteno, como se pode observar na Figura 3.4 (**A**). Também foram calculados os respetivos rendimentos por RMN obtendo-se 35% de rosamina **3** e 65% da sua forma reduzida. Os espectros **B**, **C** e **D** correspondem às optimizações efetuadas usando um novo protocolo de

redução, no qual o ciclohexeno é usado para gerar hidrogénio *in situ*, verificando-se que em **B** e **C** ainda se observa sinais referentes ao composto de partida (rosamina **2**), como por exemplo o duplete ($J= 8,8$ Hz) a 8,52 ppm correspondente aos prótons H-3', 5' e o duplete ($J= 8,8$ Hz) a 7,68 ppm relativo aos prótons H-2', 6'. Calculando o rendimento tendo por base os espectros foi possível obter em **B** 59% e em **C** 71%, concluindo assim que a síntese não foi completa. Em **D**, referente ao espectro com o aumento da proporção de ciclohexeno (3 equiv), verificou-se a conversão total do reagente de partida em rosamina **3**.

Como sinais caraterísticos, a rosamina **3** apresenta: um tripleto ($J= 7,2$ Hz) a 1,26 ppm e um quarteto ($J= 7,2$ Hz) a 3,56 ppm correspondentes ao grupo etilo; um duplete ($J= 2,4$ Hz) a 6,73 ppm relativo aos prótons H-4, 5; um duplo duplete ($J= 2,4$ Hz) a 6,80 ppm correspondente a H-2, 7; um duplete ($J= 9,6$ Hz) a 6,94 relativamente aos prótons H-1, 8; dois dupletos ($J= 8,4$ Hz) a 7,08 ppm e 7,60 ppm referentes aos prótons H-2', 6' e H-3', 5', respetivamente.

Além das rosaminas precursoras, também se preparou um ligando catecolato com um grupo metilamina em posição *orto*, de forma a que pudesse ser facilmente ligado à rosamina **1** ($R=COOH$) e à rodamina comercial 5(6)-carboxitetrametilrodamina. Os sinais que melhor caraterizam o precursor 2,3-dibenziloxibenzilamina (ver Tabela 10) são: um singuleto à frequência de ressonância 3,79 ppm correspondente ao sinal devido aos prótons do grupo $-CH_2NH_2$, dois singuletos a 5,11 ppm e 5,16 ppm relativos à ressonância dos dois grupos $-CH_2C_6H_5$, um duplo duplete ($J= 6,0$ Hz e $J= 1,6$ Hz) a 6,92 ppm referente a H-6, um duplo duplete ($J= 6,0$ Hz e $J= 1,6$ Hz) a 6,95 ppm correspondente a H-4, um tripleto ($J= 6,0$ Hz) a 7,02 ppm relativo a H-5 e ainda um conjunto de sinais entre 7,35-7,33 ppm que, de acordo com a sua multiplicidade, correspondem à ressonância dos anéis aromáticos dos dois grupos benzilo ($CH_2C_6H_5$).

Tabela 10. Desvios químicos (δ /ppm) dos sinais obtidos pelos espectros de RMN de 1H do 2,3-dibenziloxibenzilamina.

	$-CH_2NH_2$	$2x -CH_2C_6H_5$	H-6	H-4	H-5	$2x-CH_2C_6H_5$
	s	2s	dd	dd	t	m
2,3-dibenziloxibenzilamina	3,79	5,11 e 5,16	6,92	6,95	7,02	7,35-7,33

Na Figura 3.5 encontra-se o espectro de RMN de 1H com a respetiva ampliação da região aromática.

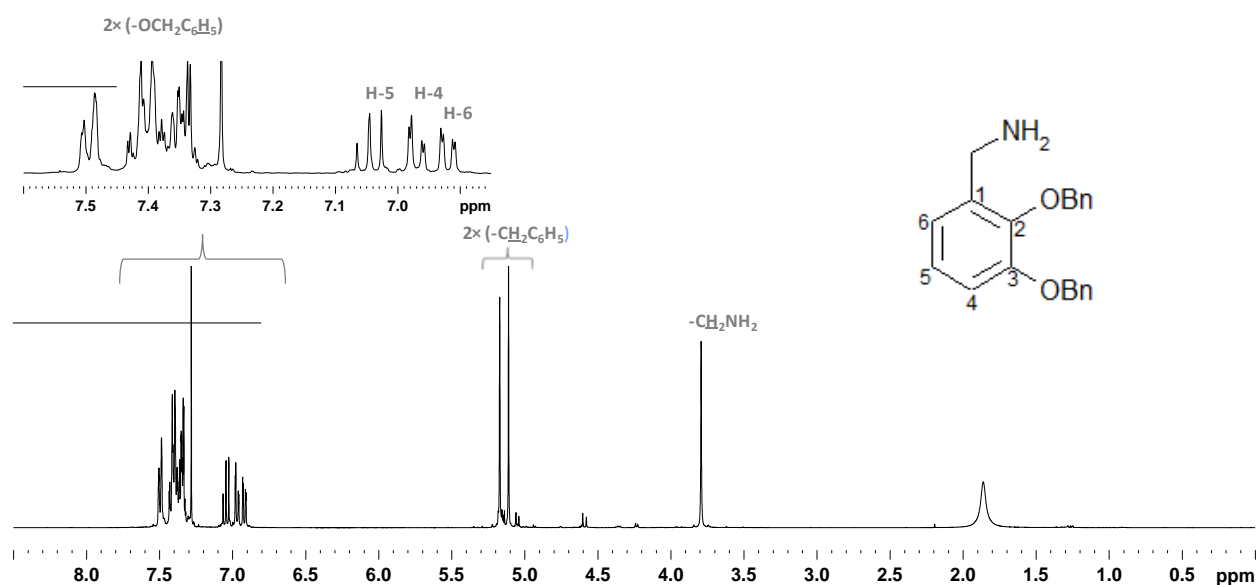


Figura 3.5. Espectro de RMN de ^1H , do precursor – 2,3-dibenziloxibenzilamina, em CDCl_3 .

3.4.2. Caraterização estrutural de conjugados rodamina-catecol

Os espectros de RMN de ^1H dos conjugados **9** e **10** combinam, de certa forma os sinais caraterísticos das rosaminas com os sinais caraterísticos do catecolato.

Assim, tal como se pode observar na Figura 3.6 os sinais que melhor caraterizam o derivado **9** são dois singuletos a 5,13 e 5,28 ppm correspondentes à ressonância dos protões dos grupos protetores $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ do catecolato. O espectro de RMN de ^1H deste conjugado apresenta ainda, na zona aromática, sinais devido à ressonância dos protões H-4'', H-5'', H-6'' e $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ do catecolato bem como sinais correspondentes à ressonância dos protões do anel xanteno. Relativamente mais desprotegido surge o duplete ($J = 8,0$ Hz) a 8,20 ppm correspondente a H-3', 5' e um triplete ($J = 6,0$ Hz) a 8,40 ppm correspondente ao NH. Já no espectro de RMN de ^1H do conjugado **10** é possível observar a ausência dos dois singuletos correspondentes aos grupos $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$. Os restantes sinais não sofrem grandes alterações com a remoção dos grupos protetores. É ainda de salientar a ausência do sinal devido à ressonância do NH o que se deve ao facto de se ter realizado o espectro em metanol- d_4 , ocorrendo troca do protão pelo deutério.

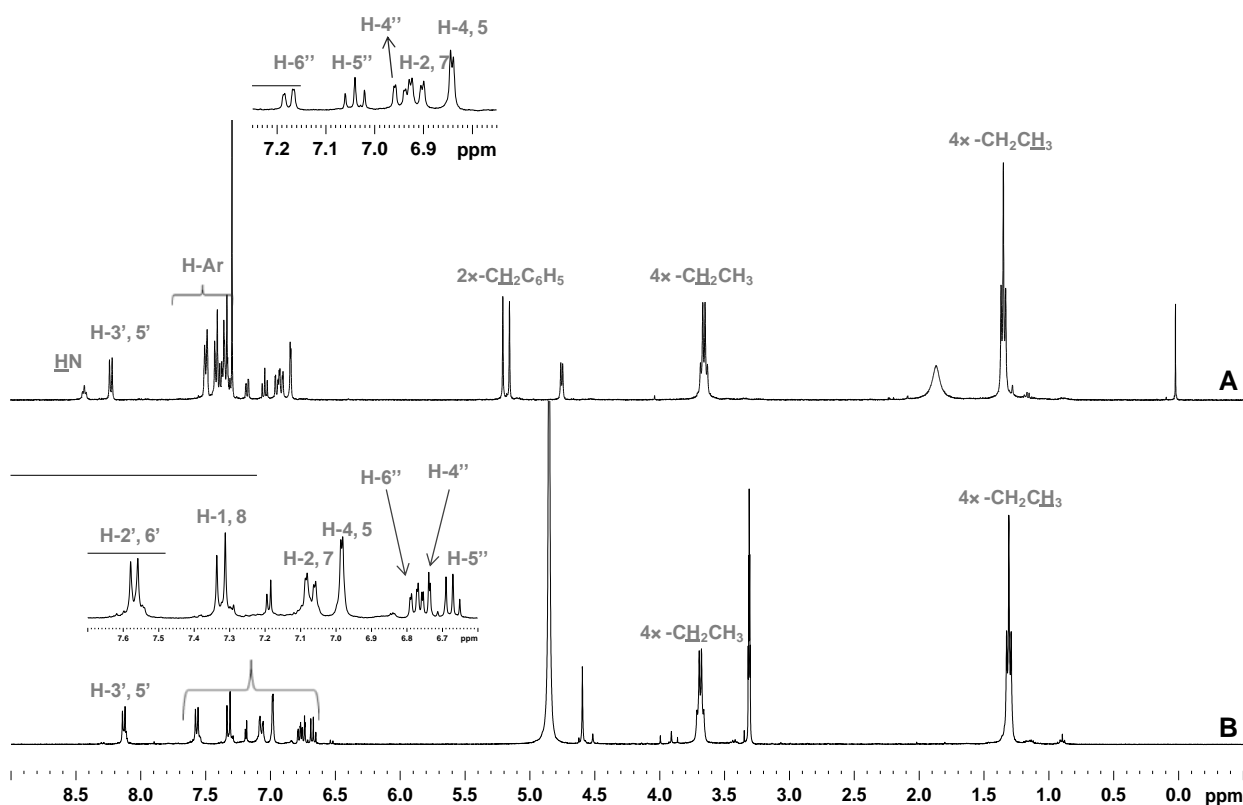


Figura 3.6. Espectros comparativos de RMN de ^1H . A – conjugado **9** em CDCl_3 e B – conjugado **10**, em MeOD-d_4 .

Dada a importância que os conjugados **10** e **12** têm para o desenvolvimento deste trabalho, de seguida será descrita uma análise mais detalhada da sua caracterização estrutural.

Assim o espectro de RMN de ^{13}C do conjugado **10** encontra-se representado na Figura 3.7. A atribuição inequívoca dos sinais foi realizada recorrendo também aos espectros bidimensionais, incluindo COSY, HSQC e HMBC, (ver Figura 3.8, Figura 3.9 e Figura 3.10, respetivamente).

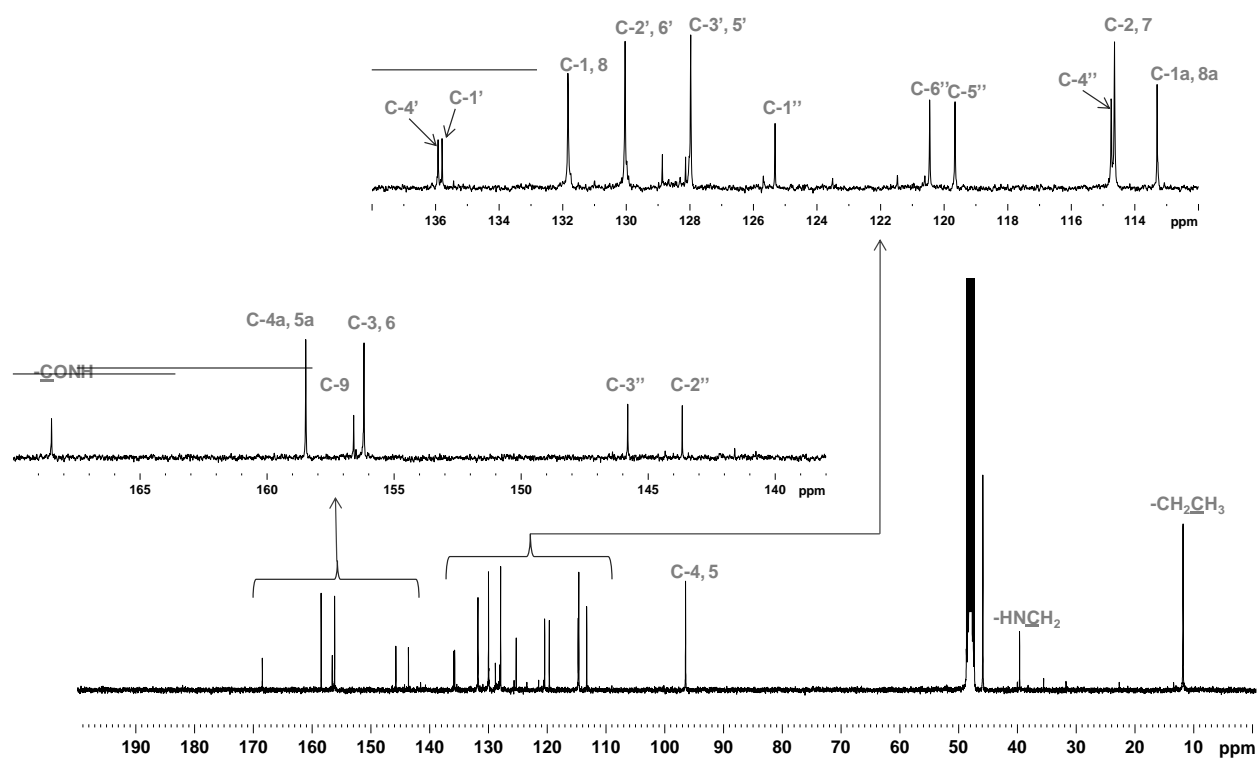


Figura 3.7. Espetro de RMN de ^{13}C e respetiva expansão da zona aromática do conjugado **10** em MeOD-d_4 .

O espectro de COSY representado permite identificar os prótons acima assinalados no espectro de RMN de ^1H .

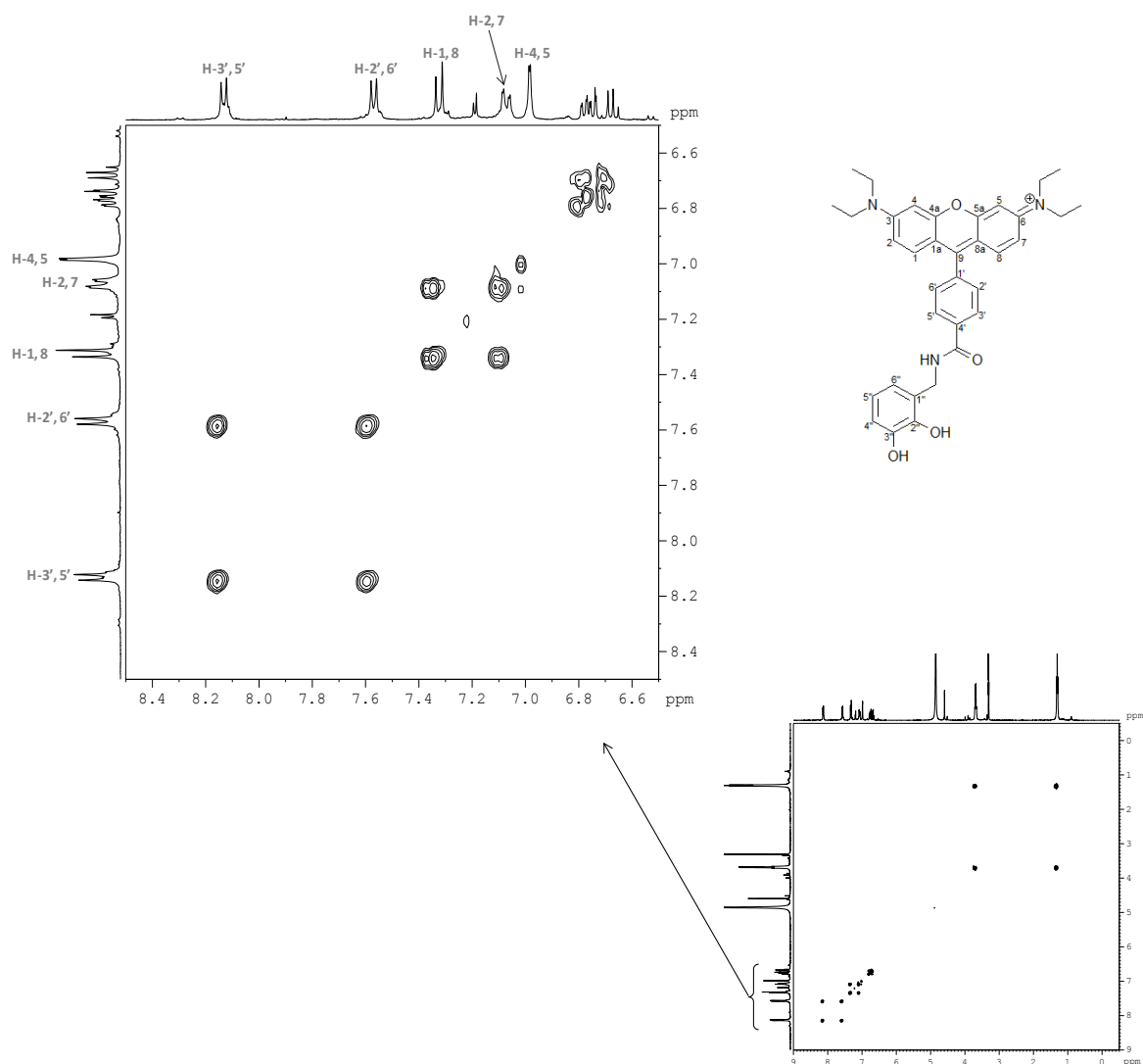


Figura 3.8. Espectro de COSY do conjugado **10** e respetiva expansão da zona aromática em MeOD-d_4 .

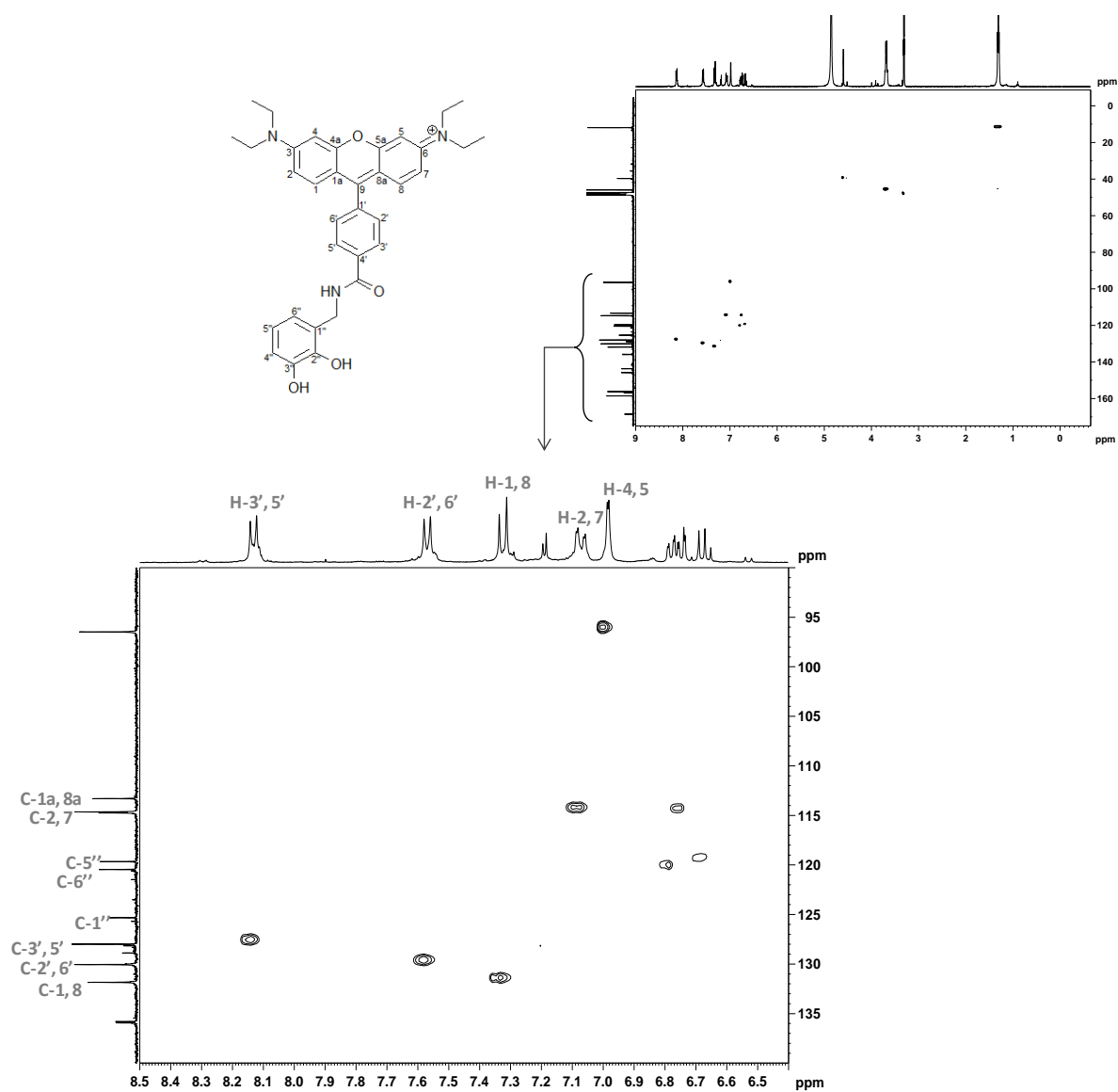


Figura 3.9. Espectro de HSQC do conjugado **10** e respetiva expansão da zona aromática em MeOD-d₄.

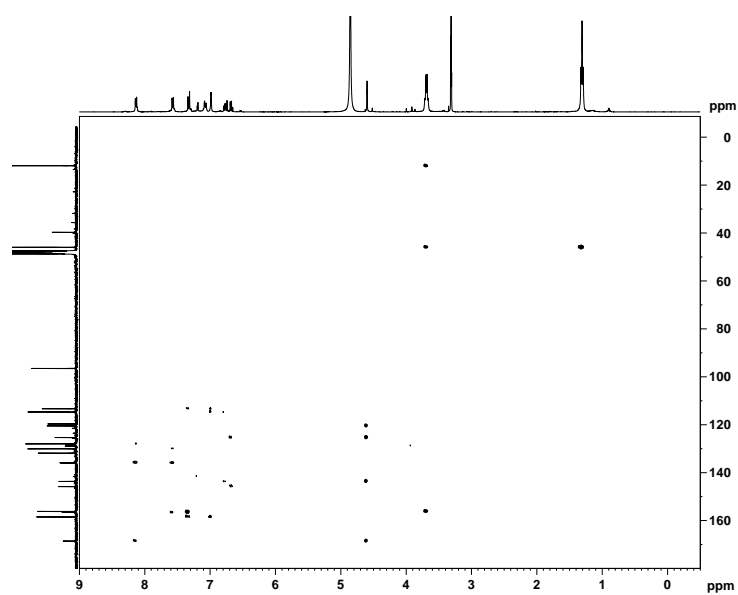


Figura 3.10. Espectro de HMBC do conjugado **10** em MeOD-d₄.

Os estudos de RMN dos compostos **10** e **12** foram realizados num solvente prótico (MeOD- d_4) e aprótico (DMSO- d_6), com o objetivo de retirar mais informações relativas aos grupos mais acídicos (OH e NH) dos derivados obtidos.

Na Figura 3.11 encontram-se os espectros de RMN de ^1H em DMSO- d_6 , os quais fazem a comparação dos dois compostos sintetizados.

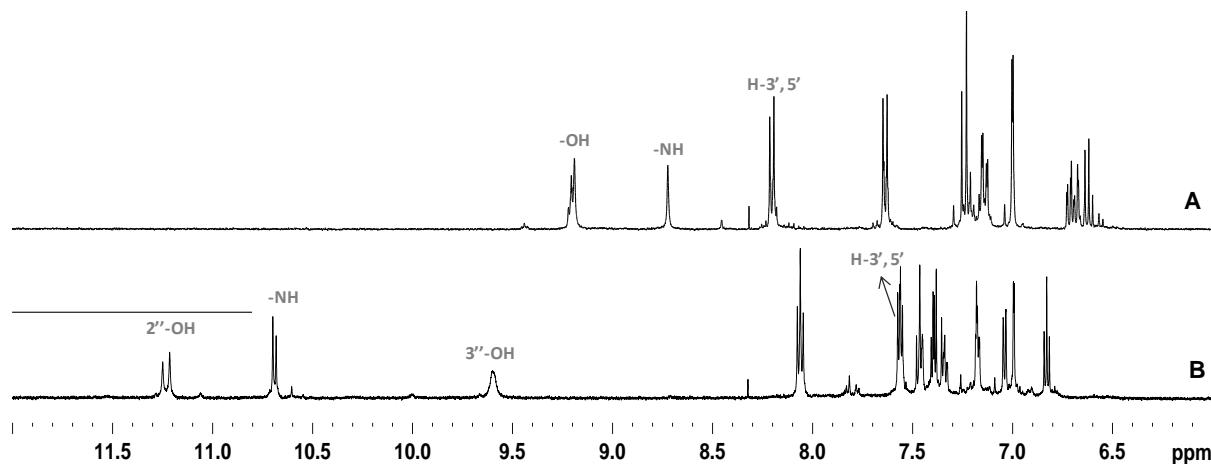


Figura 3.11. Espectro de RMN de ^1H parcial dos conjugados **10** (A) e **12** (B), em DMSO- d_6 .

Através da análise dos espectros de RMN, é possível obter informação sobre a influência da função amida nos desvios químicos e nas ligações por pontes de hidrogénio dos ligandos. No que diz respeito ao espectro de RMN de ^1H de **10**, em DMSO- d_6 , nota-se que o grupo $\text{C}=\text{O}$ da amida, o qual está diretamente ligado ao anel fenilo da rodamina, tem um forte efeito de desproteção no deslocamento dos protões *orto* do anel fenilo, e, conseqüentemente, os protões H-3', 5' surgem a 8,20 ppm. Na região alifática do espectro, o sinal correspondente à ressonância do grupo CH_2 aparece a 4,50 ppm e apresenta correlações de HMBC com um carbono a 165,8 ppm, que foi atribuído ao carbono $\text{C}=\text{O}$ da amida (ver Figura 3.7 e Figura 3.10). Os desvios químicos dos protões mais desprotegidos são: (i) um singuleto a 8,72 ppm, atribuída à ressonância do -NH e (ii) um multiplete a 9,19-9,21 ppm, atribuída aos dois grupos OH. Comparando com **12**, o espectro de RMN de ^1H apresenta a 7,55-7,58 ppm o sinal correspondente a H-3', 5', que surge mais protegido devido à influência do grupo dador de eletrões -NH da amida diretamente ligada ao anel fenilo da rodamina. Estes protões H-3', 5' exibem correlação por HMBC com um carbono a 168,1 ppm, que foi atribuído ao carbono $\text{C}=\text{O}$ da amida. Os protões mais desprotegidos são: (i) um multiplete, que surge a 11,25-11,21 ppm, atribuído à ressonância dos protões do grupo 2''-OH, o mais ácido dos protões e, (ii), um multiplete a 10,70-10,68 ppm, atribuída à ressonância de -NH (este valor de desvio químico é típico das catecolamidas).⁴⁴ Esta forte desproteção observada no conjugado **12** é devida à ligação por ponte de hidrogénio do grupo 2''-OH e do grupo carbonilo da amida (ver Figura

3.12). Este efeito de desproteção é menos forte no conjugado **10** uma vez que a distância entre o grupo 2''-OH e o grupo carbonilo é maior (ligação por ponte de hidrogénio mais fraca).

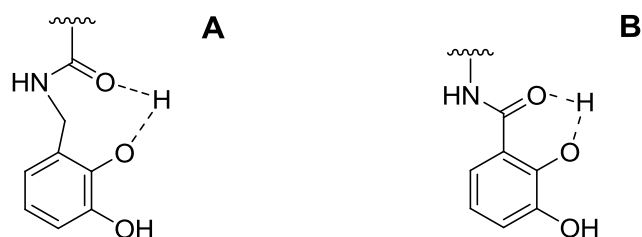


Figura 3.12. Função amida dos conjugados **10** (A) e **12** (B).

Os desvios químicos relativos aos espetros de RMN de ^1H e ^{13}C para todos conjugados rodamina-catecol (**9-12**) encontram-se sumarizados no Tabela 11 e Tabela 12, respetivamente.

Tabela 11. Desvios químicos (δ/ppm) dos sinais obtidos nos espetros de RMN de ^1H dos conjugados **9-12**.

	9	10	11	12
Solvente	CDCl_3	DMSO-d_6	CDCl_3	DMSO-d_6
4x $-\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,33	1,31	1,36	1,22-1,28
4x $-\text{CH}_2\text{CH}_3$	3,63	3,69	3,69	3,66-3,71
2x $-\text{OCH}_3$	-	-	3,97 e 4,10	-
$-\text{NHCH}_2$	4,73	4,60	-	-
3'' $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	5,13	-	-	-
2'' $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	5,18	-	-	-
H-4, 5	6,81	6,98	6,86	6,99
H-2, 7	6,89	7,07	6,98	7,17-7,19
H-4''	6,92	6,75	7,16	7,04
H-5''	7,01	6,67	7,26	6,83
H-6''	7,15	6,78	7,82	7,45-7,48
2x $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	7,30-7,40 e	-	-	-
H-1, 8	7,46-7,48	7,32	7,49	7,38-7,41
H-2', 6'		7,57	8,17	8,05-8,08
H-3', 5'	8,20	8,13	7,43	7,55-7,58
$-\text{NHCH}_2$	8,40	-	10,45	10,70-10,68
-OH	-	-	-	9,60 e 11,25-11,21

Tabela 12. Desvios químicos (δ /ppm) os sinais obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C dos conjugados **9-12**.

	9	10	11	12
Solvente	CDCl_3	DMSO-d_6	CDCl_3	DMSO-d_6
$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	12,8	11,8	13,6	13,8
$-\text{HNCH}_2$	39,5	39,6	-	-
$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	46,3	45,9	47,1	45,8
$\text{C-3''}-\text{OCH}_3$	-	-	57,1	-
$\text{C-2''}-\text{OCH}_3$	-	-	62,8	-
$2\times -\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	75,0 e 71,2	-	-	-
C-4, 5	96,6	96,5	97,5	96,5
C1a, 8a	*	113,3	114,2	*
C-4''	113,3	114,7	117,1	119,2
C-2, 7	114,4	114,6	115,1	115,1
C-6''	122,0	120,5	123,8	*
C-5''	124,5	119,7	125,8	118,6
C-1''	*	125,3	127,9	*
C-3', 5'	128,1	128,0	121,3	130,9
C-2', 6'	*	130,0	131,6	*
C-1, 8	*	131,8	133,1	132,2
C-4'	*	135,8	141,6	*
C-1'	*	135,9	127,3	*
C-2''	142,5	143,7	148,3	*
C-3''	151,9	145,8	153,6	*
C-3, 6	*	156,2	156,4	*
C-9	*	156,6	158,1	*
C-4a, 5a	*	158,5	158,9	*
-CONH	166,0	168,5	164,6	168,1

*Não se conseguiu fazer a atribuição inequívoca destes sinais.

Conservaram-se os tubos de RMN em DMSO-d_6 contendo os conjugados **10** e **12** com o objetivo de efetuar estudos de estabilidade ao longo do tempo, tendo-se realizado espectros de RMN de ^1H nos períodos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e um mês. Verificou-se que no decurso do tempo estes compostos apresentam estabilidade neste solvente, não se verificando quaisquer alterações significativas nos desvios químicos dos dois derivados (ver Tabela 13). Houve a necessidade de se realizar este estudo de estabilidade em DMSO-d_6 , para dar resposta a alterações que se estavam a observar nos espectros de UV-Vis dos compostos, nomeadamente do composto **10** em DMSO . No entanto, os resultados de estabilidade de **10** ao longo do tempo mostraram que o composto é estável, tal como se observa na Figura 3.13. Provavelmente, as alterações que se observaram nos espectros de UV-Vis poderão estar relacionadas com alterações na composição do DMSO que inicialmente era seco, no entanto, ao longo do tempo este vai ganhando humidade, alterando assim a sua composição.

Tabela 13. Resultados obtidos por RMN de ^1H , para os conjugados **10** e **12** em DMSO- d_6 ao longo do tempo.

10	-OH	-NH	H-3',5'	H-2', 6'	H-1, 8	H-2,7	H-4,5	H-6''	H-4''	H-5''	4x (-CH_2 CH_3)	4x ($\text{-CH}_2\text{CH}_3$)
0 h	9,21 - 9,19	8,72	8,20	7,64	7,24	7,14	7,00	6,72	6,68	6,62	3,66	1,22
24 h	9,23 - 9,18	8,72	8,19	7,63	7,24	7,13	6,99	6,72	6,68	6,62	3,66	1,22
48 h	9,23 - 9,18	8,72	8,19	7,63	7,24	7,13	6,99	6,72	6,68	6,62	3,66	1,21
72 h	9,23 - 9,18	8,72	8,19	7,63	7,24	7,13	6,99	6,71	6,67	6,63	3,66	1,21
1 mês	9,22 - 9,19	8,72	8,19	7,63	7,23	7,13	6,99	6,72	6,68	6,62	3,66	1,21

12	-OH	-NH	H-2',6'	H-3',5'	H-6''	H-1,8	H-2,7	H-4''	H-4,5	H-5''	4x (-CH_2 CH_3)	4x ($\text{-CH}_2\text{CH}_3$)
0 h	11,24- 11,21	10,68	8,06	7,56	7,46	7,39	7,17	7,04	6,99	6,82	3,77-3,68	1,25
24 h	11,24- 11,21	10,69	8,06	7,56	7,46	7,39	7,17	7,03	6,99	6,82	3,76-3,67	1,24
48 h	11,24- 11,21	10,68	8,05	7,55	7,45	7,38	7,17	7,03	6,98	6,82	3,75-3,67	1,24
72 h	11,24- 11,21	10,69	8,06	7,56	7,46	7,39	7,17	7,03	6,99	6,82	3,76-3,67	1,24
1 mês	11,24- 11,21	10,68	8,06	7,55	7,46	7,39	7,17	7,04	6,99	6,83	3,77-3,68	1,24

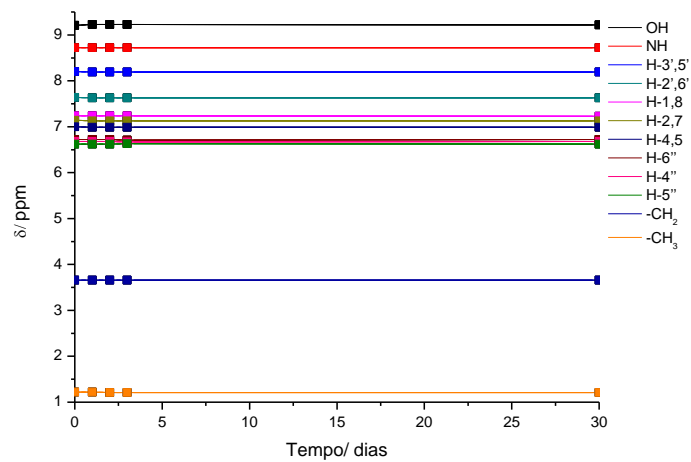


Figura 3.13. Estabilidade do conjugado **10** ao longo do tempo em DMSO- d_6 .

3.4.3. Espetrometria de massa

A caracterização por EM foi realizada utilizando como método de ionização o electrospray (ESI-QTOF). Como exemplo apresenta-se o espectro do conjugado **10**, este revelou a presença de um pico mais abundante referente ao ião molecular, $(M+H)^+$, a $m/z = 564,2857$, (ver Figura 3.14) confirmando deste modo a presença do conjugado sintetizado.

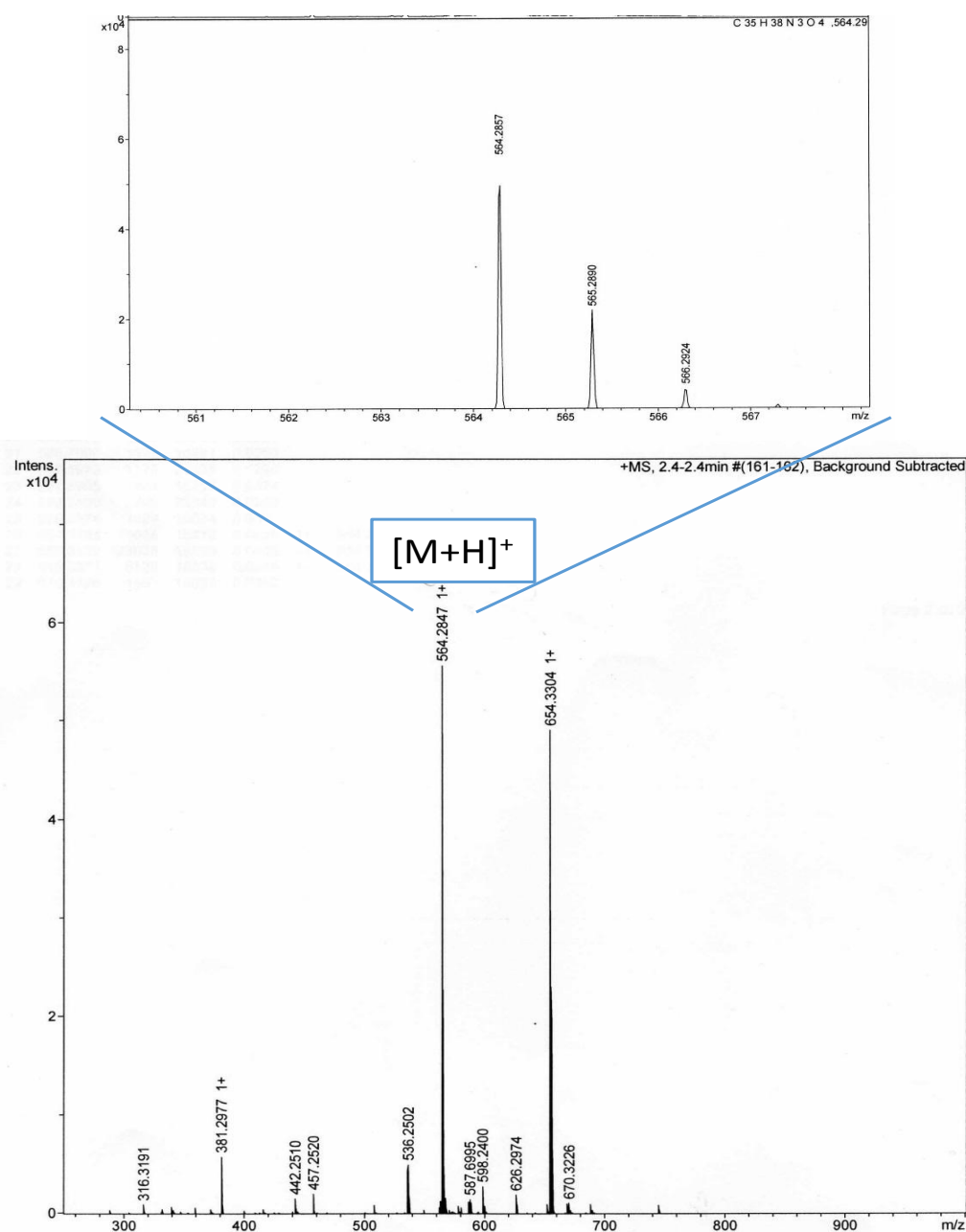


Figura 3.14. Espectro de massa referente ao conjugado **10**.

3.5. Propriedades fotofísicas

Para estabelecer as propriedades fotofísicas das diferentes rosaminas e conjugados realizaram-se estudos espectroscópicos de absorção e emissão e determinação dos respetivos rendimentos quânticos. Estes estudos compreenderam:

- estudos de estabilidade dos compostos **1**, **3** e **10** em DMSO, e DMSO com diferentes percentagens de água (10%, 20% e 30%);
- estudo das propriedades fotofísicas das rosaminas **1** e **3** em DMSO, etanol e diclorometano;
- estudos das propriedades fotofísicas dos conjugados rodamina-catecol **10** e **12** em diversos solventes, tais como: DMSO/H₂O (30%); etanol e diclorometano;
- formação de complexos de Fe(III) dos conjugados **10** e **12**.

3.5.1. Espectroscopia de UV-Vis

Efetuaram-se estudos de estabilidade dos conjugados **1**, **3** e **10** em DMSO e DMSO com diferentes percentagens de água (10%, 20% e 30%) durante dois dias de forma a verificar a estabilidade dos compostos com o decorrer do tempo nestes solventes. Após análise dos resultados foi possível observar que ao longo dos dois dias, em DMSO as rosaminas **1** e **3** revelaram-se estáveis. Já no caso do conjugado **10**, observou-se para a mistura DMSO/H₂O (30%) uma maior estabilidade ao longo do tempo, sendo este um dos solventes escolhidos para realizar os estudos das propriedades fotofísicas. Por sua vez este solvente também foi escolhido para realizar os estudos do conjugado **12**.

Após o estudo de estabilidade investigaram-se as propriedades espectroscópicas dos ligandos realizando-se estudos para os precursores **1** e **3** utilizando como solventes, o diclorometano, o etanol e o DMSO. Para os conjugados **10** e **12**, com o intuito de estudar a dependência com a polaridade dos solventes, selecionaram-se como solventes: diclorometano, etanol e uma mistura DMSO/H₂O (30%) (ver resultados na Tabela 14). Para os conjugados **10** e **12** o comprimento de onda máximo das bandas de absorção em diclorometano e etanol são muito semelhantes (563 e 559 nm, respetivamente), sendo observado um desvio batocrómico do máximo de absorção na mistura de solventes polar, DMSO/H₂O (30%) (569 e 566 nm, respetivamente). Esse desvio é causado pela presença do recetor catecol (devido à formação de pontes de hidrogénio com a água), o que também é observado para outros conjugados de catecol.⁴⁵

Tabela 14. Propriedades espectroscópicas de **1**, **3**, **10** e **12** em diferentes solventes a 25°C. E a determinação do coeficiente de absorção molar ϵ .

Composto	Solvente	$\lambda_{\text{max (abs)}} / \text{nm}$	$\epsilon / [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] \times 10^4$
1	CH ₂ Cl ₂	562	2,5
	EtOH	556	4,1
	DMSO	564	1,3
3	CH ₂ Cl ₂	550	44,3
	EtOH	547	59,8
	DMSO	556	0,6
10	CH ₂ Cl ₂	563	4,9
	EtOH	561	4,6
	DMSO/30% H ₂ O	569	4,3
12	CH ₂ Cl ₂	559	4,3
	EtOH	559	4,8
	DMSO/30% H ₂ O	566	3,3

3.5.2. Propriedades espectroscópicas a diferentes valores de pH e interação com Fe³⁺

A ideia inicial era realizar o estudo das propriedades espectroscópicas de **10** em água, no entanto, devido à baixa solubilidade desse composto nesse solvente, e conhecendo já os estudos de estabilidade, decidiu-se realizar o estudo numa mistura de H₂O/DMSO (10%), e a diferentes valores de pH entre 2 e 12, como se pode ver na Figura 3.15.

Pela análise ao espectro verifica-se que a intensidade da banda de absorção da rodamina ($\lambda_{\text{abs}} = 564 \text{ nm}$) diminui gradualmente com o aumento do valor de pH. A pH 8,05 verifica-se um decréscimo mais acentuado correspondendo ao primeiro valor de pK_a para as unidades do tipo catecol.²⁸ Por outro lado, verifica-se que a intensidade da banda a 360 nm aumenta com o aumento do valor de pH, sendo a pH 12 o valor ao qual se verifica um aumento mais acentuado desta, correspondendo ao segundo pK_a . Na Figura 3.16 encontra-se a proposta de desprotonação. Estes valores de pK_a encontram-se na gama observada para o 2,3-dihidroxibenzaldeído ($pK_{a1}=7,97$ e $pK_{a2}=12,22$).²⁸

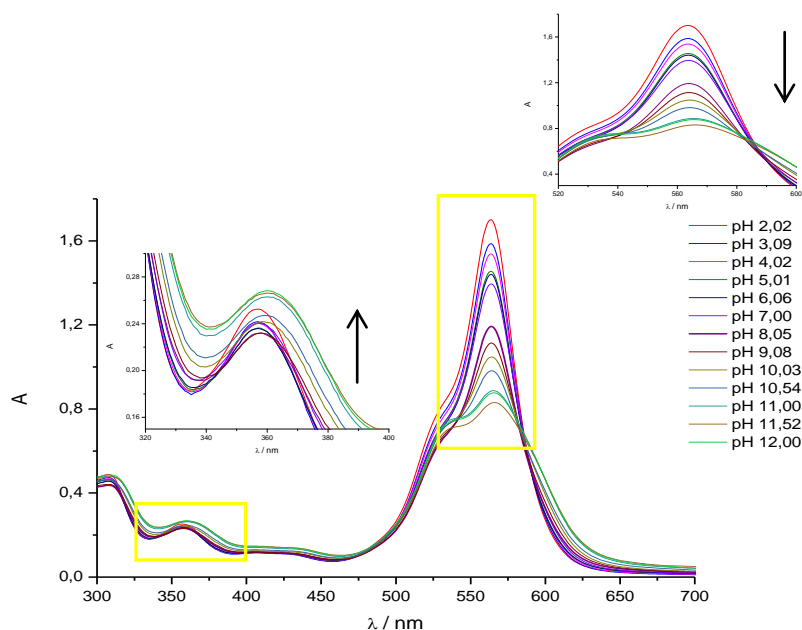


Figura 3.15. Espectro de UV-Vis de **10**, numa gama de pH 2-12, em H₂O/DMSO (10%) e 0,1 M de NaCl.

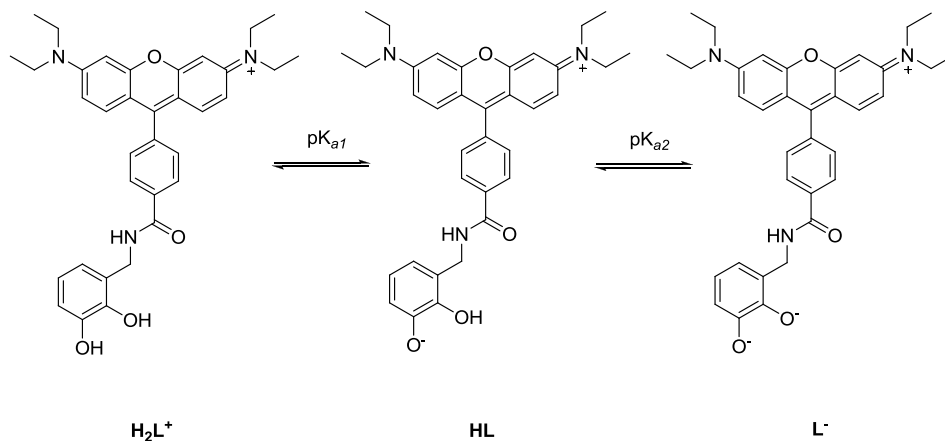


Figura 3.16. Proposta de desprotonação para o conjugado **10**.

Investigando a possibilidade deste conjugado ter capacidade para monitorizar ferro, foi testada a sua interação com Fe^{3+} , observando a sua evolução por UV-Vis. As soluções foram preparadas usando o mesmo solvente, H₂O/DMSO (10%), numa gama de pH semelhante à anterior. O conjugado **10** é um ligando bidentado e para tal foi usada uma razão de 3:1, ligando–metal, de forma a potenciar a formação do complexo FeL_3 . Na Figura 3.17, encontra-se representado o espectro a pH 2, 5, 9 e 11. A pH 2 verifica-se a inexistência de formação do complexo, contudo a partir de pH 5, observa-se um desvio batocrómico da banda a 360 nm, sendo estes resultados consistentes com a formação de complexos de Fe(III) de derivados de catecol e Fe(III).

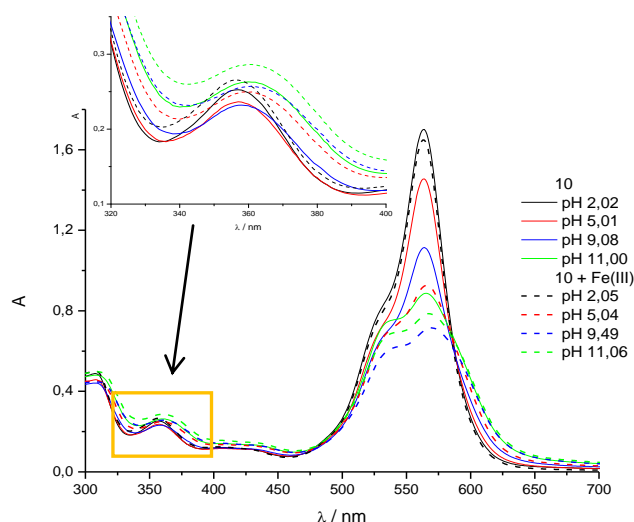


Figura 3.17. Espectro de UV-Vis de **10** comparando valores de pH 2 - 11 na presença e ausência de Fe(III) na razão 3:1 em H₂O/ DMSO (10%) e 0,1 M de NaCl.

Na Figura 3.18 pode-se observar a imagem das alíquotas obtidas a diferentes valores de pH, verificando-se que para pH ácidos, nomeadamente, pH 2, 3 e 4 a cor das soluções mantém-se rosa, no entanto, para pH mais básicos a cor altera para roxa e ocorre alguma precipitação no fundo do frasco.

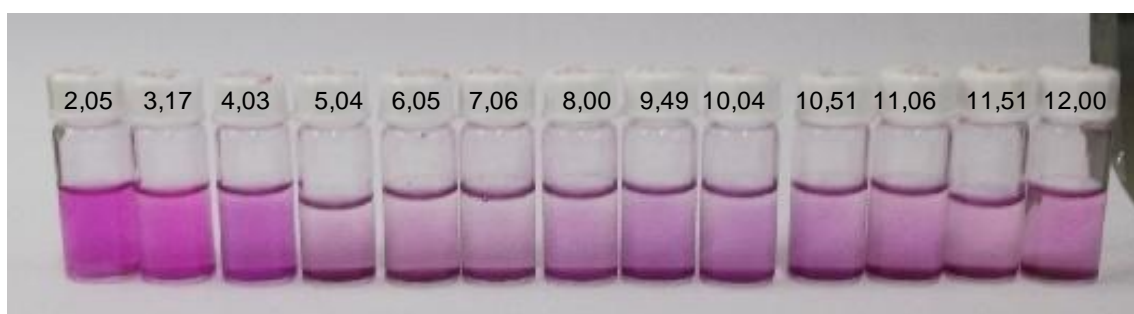


Figura 3.18. Imagem das alíquotas preparadas a diferentes pH com a adição de Fe(III) para **10**.

As propriedades de ligandos do tipo catecolamida em solução são descritas na literatura⁴⁶ e expressas pelas constantes de dissociação do precursor ácido 2,3-dihidroxibenzóico, que apresenta $pK_{a1} = 10,06$ e $pK_{a2} = 13,10$; e 2,70 para o ácido carboxílico. Valores semelhantes de pK_a são esperados para o conjugado **12** e quando comparados com o conjugado **10** esses valores são relativamente elevados devido a efeitos de interação entre a ligação de ponte de hidrogénio do grupo hidroxilo com o grupo carbonilo.

Um estudo similar foi efetuado para o conjugado **12**, contudo devido à baixa solubilidade deste conjugado na mistura de H₂O/DMSO (10%), só foram obtidos os resultados de pH entre 2-5, como se pode observar na Figura 3.19. Verifica-se a pH 2, a inexistência da formação de complexo, uma vez que não existem alterações no espectro. Porém a pH 3 e 4 existem algumas

alterações no espectro de absorção. Na Figura 3.20 pode-se observar a imagem das alíquotas obtidas, entre valores de pH 2-12 passado 24 h, verificando-se que a partir de pH 4-5 ocorre precipitação do conjugado **12**.

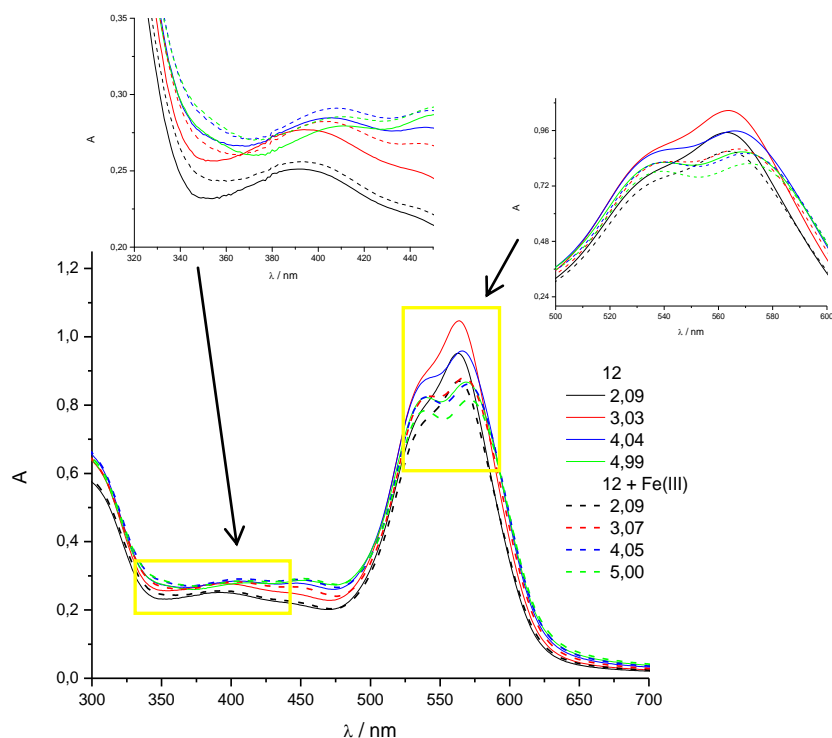


Figura 3.19. Espectro de UV-Vis de **12** com e sem adições de ferro a pH entre 2-5 em no solvente H₂O/ DMSO (10%) e 0,1 M de NaCl.

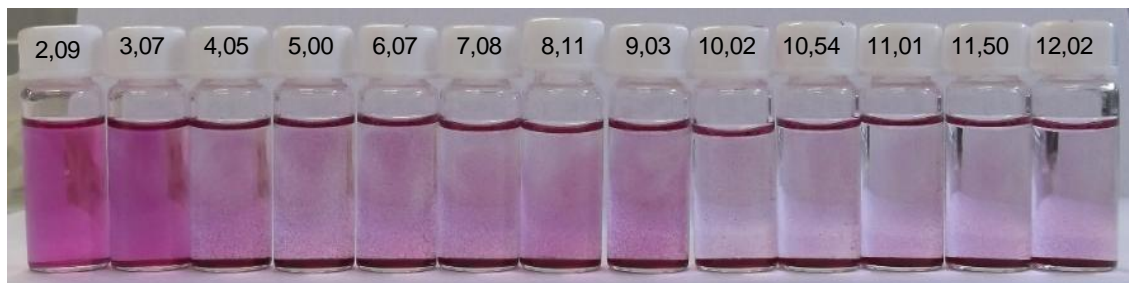


Figura 3.20. Imagem das alíquotas preparadas entre valores de pH 2-12 com a adição de Fe(III) para o conjugado **12**.

Tendo por base a estrutura do conjugado **12** (Figura 3.21) é esperado que esta tenha um comportamento similar ao sideróforo - enterobactina e seus análogos, este facto é conhecido por estudos conduzidos por Raymond e seus colaboradores.^{42,47,48} Existe uma mudança estrutural da enterobactina férrica a partir de um catecolato para uma geometria de salicilato em torno do ião metálico, onde ocorre a protonação no grupo –OH *meta* e a coordenação do Fe(III) deslocando-se para o grupo –OH *orto*. O espectro de UV-Vis obtido pode ser considerado como prova da alteração do tipo de coordenação do metal ao ligando. Em comparação com o conjugado **10** espera-se que a coordenação ao metal ocorra em ambos os grupos –OH *meta* e

orto. A Figura 3.21 representa a proposta de coordenação ao metal Fe(III) para os conjugados **10** (A) e **12** (B).

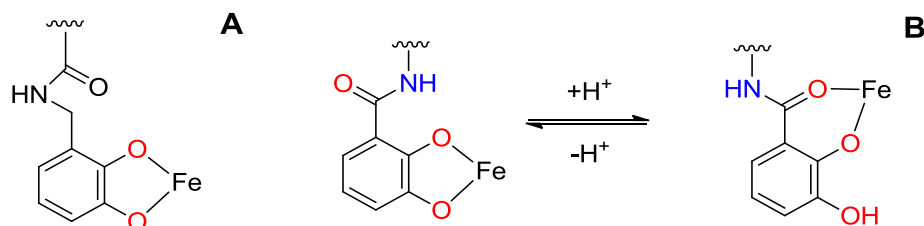


Figura 3.21. Modelos de coordenação dos conjugados **10** (A) e **12** (B).

3.5.3. Fluorescência

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos nos estudos de fluorescência realizados para os conjugados **10** e **12** e seus precursores **1** e **3**.

Em ambos os conjugados é observado um desvio nos máximos de comprimentos de onda das bandas de emissão na mistura DMSO/H₂O (30%).

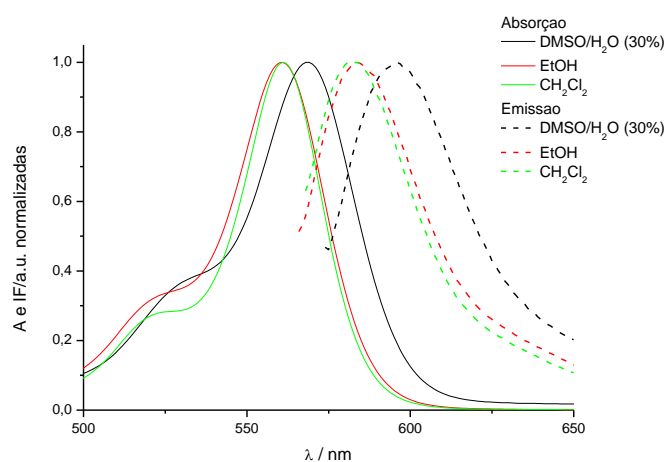
Os dados experimentais mostram que os rendimentos quânticos de fluorescência também variam de acordo com a polaridade dos solventes e são fortemente influenciados pela ligação amida, e pela natureza do substituinte introduzido na posição 4' da estrutura da rosamina. Em diclorometano e etanol, os rendimentos quânticos calculados são satisfatórios, de 0,14-0,18 para o conjugado **10** e muito baixos 0,04 para o conjugado **12**.

De facto, os valores relativamente altos de ϕ_F , determinados para **10**, podem ser uma característica relevante para potenciais aplicações destes conjugados em processos de deteção. Em contraste, um menor valor de ϕ_F foi obtido para **12**. Isto está de acordo com resultados anteriores, no qual a introdução de um átomo de azoto na posição 4' do anel fenilo da rosamina provoca uma diminuição da emissão de fluorescência do composto.²⁷ No caso dos seus precursores os rendimentos quânticos são ligeiramente superiores entre 0,28-0,44 no caso do precursor **1** e 0,20 para o precursor **3** em diclorometano.

Tabela 15. Propriedades espectroscópicas de fluorescência de **1**, **3**, **10** e **12**, em diferentes solventes a 25°C.

Determinação de rendimentos quânticos ϕ_F .			
	Solvente	$\lambda_{\text{max (em)}} / \text{nm}$	ϕ_F
1	CH ₂ Cl ₂	579	0,44
	EtOH	576	0,28
	DMSO	585	-
3	CH ₂ Cl ₂	565	0,20
	EtOH	570	0,01
	DMSO	584	-
10	CH ₂ Cl ₂	583	0,14
	EtOH	584	0,18
	DMSO/30% H ₂ O	595	-
12	CH ₂ Cl ₂	575	0,04
	EtOH	577	0,04
	DMSO/30% H ₂ O	588	-

Na Figura 3.22 e Figura 3.23 é possível observar a comparação dos espectros de absorção e emissão dos conjugados **10** e **12** nos diferentes solventes, anteriormente discutida.

**Figura 3.22.** Espectros de absorção e emissão normalizados de **10**.

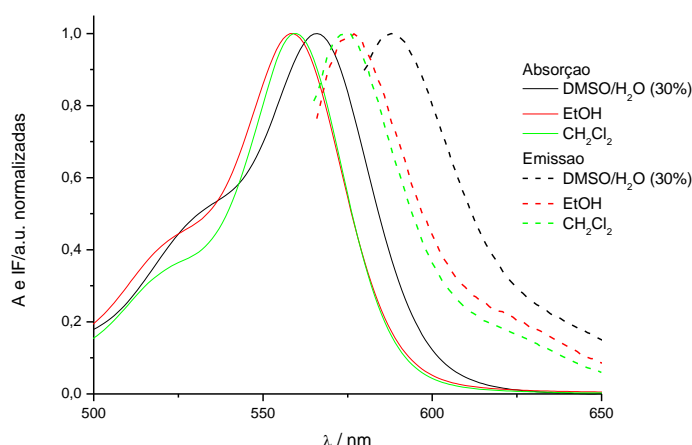


Figura 3.23. Espectros de absorção e emissão normalizados de **12**.

Considerando estudos prévios,^{44,49} bem como a importância deste tipo de ligandos para monitorizar Fe(III) presente em células, para aplicações em biomedicina, também se estudou a alteração da emissão dos conjugados **10** e **12** na presença de Fe(III) e usando MOPS (pH 7,4) como solvente.

A interação dos conjugados **10** e **12** com Fe(III) foi investigada por análise das variações observadas na intensidade de fluorescência dos ligandos - utilizando concentrações crescentes de íão de metal e uma concentração fixa de ligandos. A formação de complexos de metal em solução pode ser observada através da perda significativa na intensidade de fluorescência. Como exemplo apresenta-se na Figura 3.24, a extinção de emissão de fluorescência de **10**.

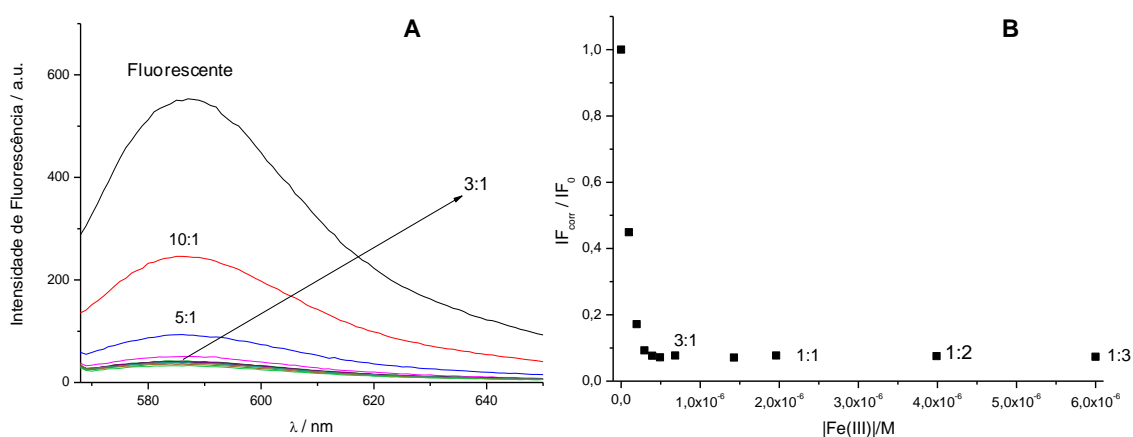


Figura 3.24. (A) Representação gráfica da intensidade de fluorescência do conjugado **10** com a adição de quantidades crescentes de Fe(III) (2 μ M, MOPS, pH 7,4, a 25 $^{\circ}$ C, λ_{exc} = 561 nm). Foram testados as razões de metal: ligando de 10:1 - 1:3. (B) Intensidade máxima de emissão a λ_{em} = 586 nm em função das concentrações de Fe(III).

Analisando a figura, pode-se concluir que a extinção de fluorescência para o Fe(III) no conjugado **10** é totalmente conseguida na razão 3:1 (ligando:metal) como era esperado, obtendo-se de percentagem de extinção da fluorescência 93%. Relativamente ao derivado **12** os resultados obtidos de interação com o Fe(III) não foram conclusivos, devido à baixa solubilidade do composto em MOPS.

Quanto ao conjugado **15** este foi obtido através de um processo mais moroso do que os conjugados **10** e **12** e dado ter sido obtido numa mistura de dois isómeros difíceis de separar e em pequena quantidade, não se realizaram os respetivos estudos das propriedades fotofísicas.

3.6. Difração de Raios-X de cristal único

Para a obtenção de cristais de ambos os conjugados foram testadas diferentes técnicas de cristalização e diferentes misturas de solventes, no entanto, apenas o conjugado **10** formou cristais em forma de agulhas de cor rosa, que foram obtidos por meio de evaporação lenta de uma solução de **10** numa mistura de metanol-CHCl₃.

A estrutura de **10** foi confirmada recorrendo à técnica de difração Raios-X de cristal único (ver Figura 3.25). O arranjo estrutural do conjugado apresenta o anel fenilo praticamente perpendicular ao anel xanteno e os dois grupos –OH do anel do catecolato com a mesma orientação que o grupo –C=O. A análise estrutural revela também a existência de interações π - π no anel xanteno. Além disso, verifica-se que o grupo OH em posição *orto* está em ponte de hidrogénio com o C=O, apresentando:

O - O=C 2,652 Å

H - O=C 1,889 Å

\angle OH - O 150,39

O grupo OH em posição *meta* está envolvido em ligações de hidrogénio do tipo OH-Cl, envolvendo átomos de cloro provenientes do contra-íão (Figura 3.25 c).

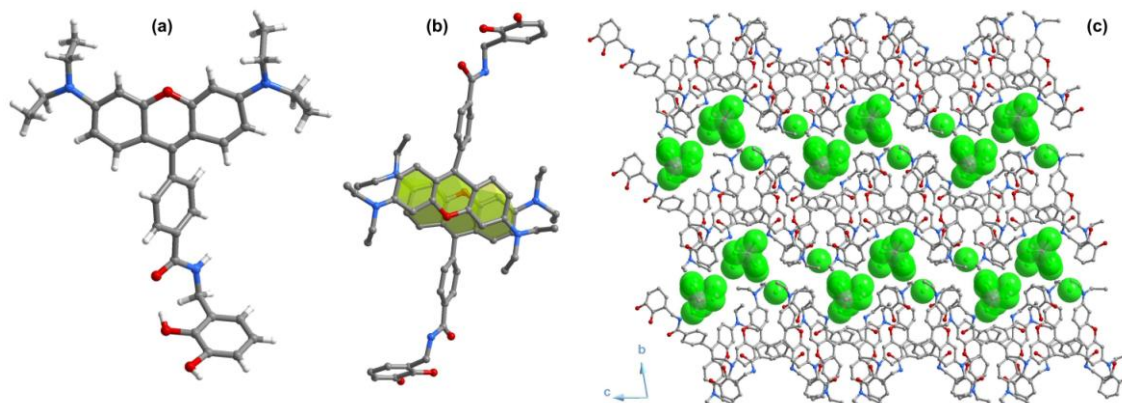


Figura 3.25. (a) Estrutura cristalina de Raios-X de **10**, (b) empacotamento de duas moléculas de **10** e (c) empacotamento cristalográfico de várias moléculas de **10**, onde a verde se representam os átomos de cloro.

Também foram conseguidos cristais do conjugado **14** (ver Figura 3.26). Neste caso, o composto foi cristalizado por evaporação lenta do solvente MeOD- d_4 usado para análise de RMN, tendo-se formado cristais rosa nas paredes do tubo após a análise.

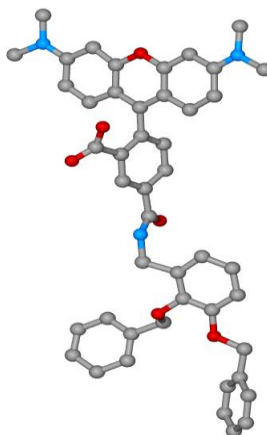


Figura 3.26. Estrutura cristalina de Raios-X de **14**.

3.7. Aplicações

3.7.1. Construção de um sensor

A monitorização de gases é um dos temas ambientais de maior relevância e de enorme destaque na sociedade. Muitos estudos têm sido desenvolvidos e cada vez mais é necessário o desenvolvimento de uma técnica de deteção que permita a medição de gases com elevado impacto ambiental, como o CO_2 , NH_3 e os VOC (compostos orgânicos voláteis) em tempo real, com grande precisão e que não acarrete elevados custos.^{50,51} A introdução da fibra ótica foi um passo importante e é umas das técnicas mais usadas até ao momento.

Um grupo de investigação da Universidad Pablo de Olavide em Espanha desenvolveu um projeto que consistia em estudar a incorporação de rosaminas microcolunares em camadas de TiO_2 (ver Figura 3.27). A rosamina usada foi a rosamina **1** sintetizada nesta dissertação.

Esse trabalho consistiu no estudo da viabilidade da incorporação de rosaminas em colunas de TiO_2 . Inicialmente efetuou-se uma solução mãe de rosamina **1** em diclorometano, e a partir desta foi possível obter várias soluções mais diluídas a fim de se executar vários testes. Da solução mãe preparada efetuou-se a medição das propriedades fotofísicas através de estudos de absorvância e fluorescência. Das soluções diluídas efetuaram-se estudos termodinâmicos e cinéticos. Nestas últimas procedeu-se à incorporação em colunas de TiO_2 e realizaram-se medições de absorvância, sendo estas medições essenciais para avaliar a concentração real incorporada e comprovar a viabilidade destes materiais.

Com a finalidade de evitar a degradação da rosamina e das diluições efetuadas, as amostras foram mantidas a baixas temperaturas, fechadas e ao abrigo da luz.



Figura 3.27. Amostras de rosaminas microcolunares em camadas de TiO_2 , com diferentes concentrações.

Após análise dos resultados obtidos concluiu-se que a incorporação da rosamina em camadas de TiO_2 é viável, e permite abrir portas para investigar as propriedades deste material como detetor de gases tóxicos. De seguida são apresentadas algumas das conclusões obtidas pelo grupo de investigação:

- De acordo com os espectros obtidos a formação do agregado é possivelmente devida à carga eletrostática, para testar esta hipótese poder-se-iam executar técnicas de espectroscopia de infravermelho. Na Figura 3.28 apresentam-se os espectros de emissão da rosamina **1** antes (A) e após incorporação no suporte sólido (B).

- Verificou-se um desvio de 4 nm entre os dois espectros o que pode significar uma possível agregação das moléculas da rosamina ao suporte sólido.

- Verificou-se que o solvente usado, o diclorometano, dá bons resultados, face a um outro solvente polar testado o etanol.

- A concentração de solução necessária para a incorporação da rosamina nas películas de TiO_2 , provou não ser muito elevada, provando que o processo de incorporação pode ser realizado com êxito usando concentrações baixas de analito.

- Processo de incorporação rápido, cerca de 35 minutos.

- Compatibilidade com o modelo de adsorção de Langmuir e a cinética de Elovich.

- O fator limitante no processo de incorporação é a disponibilidade de pontos de ancoragem microcolunares à superfície do TiO_2 .

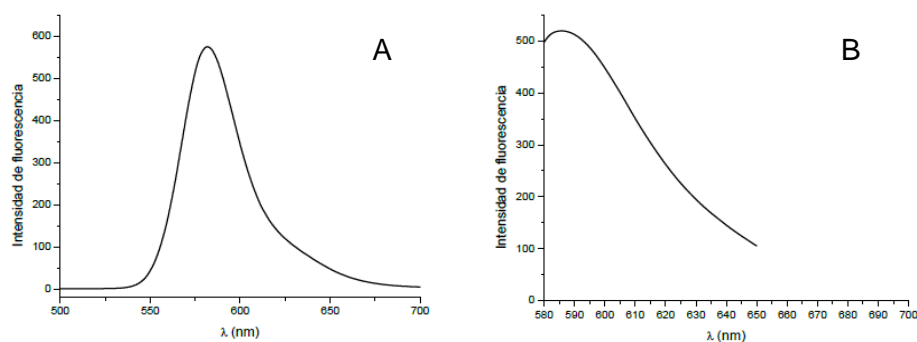


Figura 3.28. Espectro de emissão da rosamina **1** antes (A) e após incorporação com TiO_2 (B).

CAPÍTULO IV

Conclusões

4. Conclusões

Os objetivos deste trabalho consistiram na preparação de rosaminas precursoras substituídas na posição 4' recorrendo a reações de condensação de benzaldeído *p*-substituído e 3-dietilaminofenol, seguindo-se oxidação com cloranil. Em todas as reações de rosaminas 4'-substituídas foram implementadas e testadas metodologias menos poluentes e mais sustentáveis, como o recurso à água como solvente da reação, bem como o recurso ao aquecimento por micro-ondas, obtendo-se rendimentos considerados elevados. Após síntese destas rosaminas 4'-substituídas foi possível proceder ao seu acoplamento usando para isso unidades quelantes do tipo catecol e utilizando diferentes agentes de acoplamento.

A síntese dos conjugados **10** e **12** foi bem sucedida obtendo-se rendimentos elevados no caso de **10** e ligeiramente inferiores no caso de **12** muito provavelmente pelo facto de se ter procedido a duas desproteções dos grupos protetores.

A síntese do conjugado **15** obtido por acoplamento de 5(6)-carboxitetrametilrodamina ao catecol, seguindo-se tratamento em atmosfera de hidrogénio catalisada pelo Pd/C, foi bem sucedida apesar dos baixos rendimentos obtidos, uma vez que foi possível a separação por cromatografia de camada fina preparativa dos dois isómeros o 4' e o 5'.

Foram igualmente realizadas outras sínteses nomeadamente a síntese da rodamina **5** e respetivo acoplamento originando o conjugado **13**. Em ambas as reações foi difícil proceder às suas purificações, sendo que este último - conjugado **13**, além de se obter em pequenas quantidades também não se conseguiu purificar na totalidade, apresentando contaminações provenientes da 2,3-dibenziloxibenzilamina, pelo que não se procedeu à desproteção dos grupos benzilo. No futuro, a síntese da rodamina **5** e seu respetivo acoplamento a uma unidade do tipo catecol será uma área a investir, procurando novas alternativas à metodologia das sínteses já descritas.

Através dos estudos de interação de Fe(III) realizados para os conjugados **10** e **12** foi possível verificar que para o conjugado **10** a partir de pH 5, se observa um desvio batocrómico da banda a 360 nm e o possível início da formação do complexo de Fe(III). O mesmo se verifica para o conjugado **12** porém devido à baixa solubilidade deste conjugado na mistura de H₂O/DMSO (10%), só foram obtidos os resultados de pH entre 2-5, verificando-se alterações nos espetros entre pH 3-4.

A concepção de quimiossensores seletivos e sensíveis a iões de metal é uma das áreas mais investigadas na atualidade. Nesta dissertação foi demonstrado que dois dos conjugados sintetizados – o conjugado **10** e **12** respondem à presença de Fe(III). Verificando-se que no caso do conjugado **10** este apresentava uma boa seletividade para o ião de metal estudado, apresentando uma percentagem de extinção de fluorescência de 93%.

CAPÍTULO V

Referências Bibliográficas

-
- ¹ New E., *Dalton Trans* **42** (2013): 3210-3219.
- ² Basabe-Desmonts L., Reinhoudt D., Crego-Calama M., *Chem. Soc. Rev.* **36** (2007): 993-1017.
- ³ Lavis L., Raines R., *Chem. Biol.* **3** (2008): 142-155.
- ⁴ Czarnik A., *Acc. Chem. Res.* **27** (1994): 302-308.
- ⁵ Sahoo S., Sharma D., Bera R., Crisponi G., Callan J., *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012): 7195-7227.
- ⁶ Formica M., Fusi V., Giorgi L., Micheloni M., *Coord. Chem. Rev.* **256** (2012): 170– 192.
- ⁷ Rogers K., Poziomek E., *Chemosphere* **33** (1996): 1151-1174.
- ⁸ Lakowicz J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3th ed. Berlin, 2006.
- ⁹ McCullagh J., Daggett K., *J.Chem. Educ.* **84** (2007): 1799-1802.
- ¹⁰ Domaille D., Que E., Chang C., *Nat. Chem. Biol.* **4** (2008): 168-175.
- ¹¹ Hossain Z., Luckham E., McFadden J., Brennan D. *Anal. Chem.* **81** (2009): 9055–9064.
- ¹² Liana D., Raguse B., Gooding J., Chow E. *Sens. (Basel)* **12** (2012): 11505–11526.
- ¹³ Wolfbeis, O., *Chem. Soc. Rev.* **15** (2005): 2657-2669.
- ¹⁴ Jiao G., Castro J., Thoresen L., Burgess K., *Org. Lett.* **5** (2003): 3675-3677.
- ¹⁵ Ahn Y., Lee J., Chang Y., *JACS commun.* **129** (2007): 4510-4511.
- ¹⁶ Lodeiro C., Capelo J., Mejuto J., Oliveira E., Santos H., Pedras B., Nunez C., *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010): 2948-2976.
- ¹⁷ Epsztejn S., Kakhlon O., Glickstein H., Breuer W., Cabantchik I., *Anal. Biochem.* **248** (1997): 31-40.
- ¹⁸ Zhou T., Ma Y., Kong X., Hider R., *Dalton Trans.* **41** (2012): 6371-6389.
- ¹⁹ Benite A., Machado S., *Quím. Nova* **25** (2002): 1155-1164.
- ²⁰ Raymond K., Dertz E., Kim S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (2003): 3584-3588.
- ²¹ Leite A., Silva A., Silva L., Castro B., Gameiro P., Rangel M., *Dalton Trans* **42** (2013): 6110-6118.
- ²² Lee M., Giap T., Kim S., Lee Y., Kang C., Kim J., *Chem. Commun.* **46** (2010): 1407–1409.
- ²³ Mei L., Xiang Y., Li N., Tong A., *Talanta* **72** (2007): 1717-1722.
- ²⁴ Kim, H., Lee M., Kim H., Kim J., Yoon J., *Chem. Rev.* **37** (2008): 1465-1472.
- ²⁵ Lin W., Long L., Chen B., Tan W., Gao W., *Chem. Commun.* **46** (2010): 1311-1313.
- ²⁶ Chen X., Pradhan T., Wang F., Kim J., Yoon J., *Chem. Rev.* **112** (2012): 1910-1956.
- ²⁷ Cardoso I., Amorim A., Queirós C., Lopes S., Gameiro P., Castro B., Rangel M., Silva A., *Eur. J. Org. Chem.* **29** (2012): 5810–5817.
- ²⁸ Queirós C., Silva A., Lopes S., Ivanova G., Gameiro P., Rangel M., *Dyes Pigments* **93** (2012): 1447–1455.
- ²⁹ Fery-Forgues S., Lavabre D., *J. Chem. Educ.* **76** (1999): 1260-1264.

-
- ³⁰ Williams A., Winfield S., Miller J. *Analyst* **108** (1983): 1067-1071.
- ³¹ Narayan S., Muldoon J., Finn M., Fokin V., Kolb H., Sharpless K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005): 3275-3279.
- ³² Chanda A., Fokin V., *Chem. Rev.* **109** (2009): 725-748.
- ³³ Buttler R., Coyne A., *Chem. Rev.* **110** (2010): 6302-6337.
- ³⁴ Quinn J., Bryant C., Golden K., Gregg B., *Tetrahedron Lett.*, **51** (2010): 786–789.
- ³⁵ Chapman N., Conway B., OGrady F., Wall M., *Synlett* **7** (2006): 1043-1046.
- ³⁶ Obermayer D., Glasnov T., Kappe C., *J. Org. Chem.* **76** (2011): 6657-6669.
- ³⁷ Valeur E., Bradley M., *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009): 606-631.
- ³⁸ El-Faham A., Funosas R., Prohens R., Albericio F., *Chem. Eur. J.* **15** (2009): 9404-9416.
- ³⁹ Álvarez J., *Synlett* **23** (2012): 1849-1850.
- ⁴⁰ Tofteng A., Pedersen S., Staerk D., Jensen K., *Chem. Eur. J.* (2012): 9024-9031.
- ⁴¹ Kunishima M., Kawachi C., Hioki K., Terao K., Tani S., *Tetrahedron* **57** (2001): 1551-1558.
- ⁴² Cohen S., Raymond K., *Inorg. Chem.* **39** (2000): 3624-3631.
- ⁴³ Gonsalves A., Melo T., “Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear”, Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra, 2007.
- ⁴² A.-K. Duhme, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **5** (1997): 773-778.
- ⁴⁵ Riedel F., Spange S., *J. Phys. Org. Chem.* **25** (2012): 1261-1268.
- ⁴⁶ Uppal R., Israel H., Incarvito C., Valentine A., *Inorg. Chem.* **48** (2009): 10769–10779.
- ⁴⁷ Hay B., Vargas D., Raymond J., *Inorg. Chem.* **40** (2001): 3922-3935.
- ⁴⁸ Abergel R., Warner J., Shuh D., Raymond K., *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006): 8920-8931.
- ⁴⁹ Moniz T., Nunes A., Silva A., Queirós C., Ivanova G., Gomes M., Rangel M., *J. Inorg. Biochem.* **121** (2013): 156-166.
- ⁵⁰ Castillero P., Sanchez-Valencia J., Cano M., Pedrosa J., Roales J., Barranco A., González-Elípe A., *Appl. Mater. Interfaces* **2** (2010): 712–721.
- ⁵¹ Orellana G., Haigh., *Curr. Anal. Chem.* **4** (2008): 273-295.